



**Élia Sofia Oliveira
Maricato**

**Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis
em meio ácido com actividade antioxidante**



**Élia Sofia Oliveira
Maricato**

**Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis
em meio ácido com actividade antioxidante**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Especialidade Bioquímica Alimentar (2º Ciclo), realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, Pós-doc da Universidade de Aveiro.

Projecto co-financiado pela União Europeia e pelo FEDER através do programa QREN

Trabalho enquadrado no projecto WineSulFree – Avaliação de tecnologias que permitam a redução do teor de sulfitos dos vinhos (Referência BI/UI51/4624/2009) e no trabalho de pós-doutoramento SFRH/BPD/46584/2008

Aos meus pais

O júri

Presidente

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Co-orientador

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
Pós-doc da Universidade de Aveiro

Arguente

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Doutor Manuel António Coimbra pela oportunidade de realização desta dissertação. Agradeço toda a orientação, competência, disponibilidade e conhecimentos que me transmitiu e que contribuíram positivamente para a construção do meu perfil profissional.

À minha co-orientadora Doutora Cláudia Nunes, pelo conhecimento e disponibilidade no acompanhamento desta dissertação, além de todo o apoio na discussão ou esclarecimento de qualquer dúvida. Agradeço ainda todo o incentivo e amizade.

À Doutora Alexandra Nunes pela preciosa ajuda na análise dos espectros de FTIR.

A todos os meus colegas de laboratório pois todos foram igualmente importantes ao longo deste trabalho. Agradeço toda a ajuda, encorajamento e amizade.

Aos meus pais e irmãos, para os quais não existem palavras que possam descrever o sentimento que tenho por eles e o que fizeram por mim para alcançar mais um sucesso na minha vida.

Ao João, por incentivar os meus sonhos, apoiar e aconselhar nas minhas decisões além de toda a sua amizade e amor.

Palavras-chave

Quitosana, *crosslinking*, *genipin*, *grafting*, ácido cafeico, actividade antioxidante, solubilidade, FTIR

Resumo

A quitosana é um polissacarídeo constituído maioritariamente por resíduos de D-glucosamina e, em menor número, por resíduos de N-acetil-D-glucosamina com ligação β -1,4. A quitosana tem a capacidade de formar filmes com capacidade antioxidante mas que são solúveis em soluções ácidas.

Neste trabalho procedeu-se ao desenvolvimento de uma metodologia para a produção de filmes com base em quitosana insolúveis em meio ácido e com capacidade antioxidante para poderem ser aplicados no processo de vinificação para a substituição da adição de SO_2 .

Com este objectivo foi optimizada uma metodologia para ligação do ácido cafeico (Caf), composto fenólico com actividade antioxidante, por mecanismo radicalar com recurso a agentes oxidantes como persulfato de potássio (KPS) e o hexanitrocerato (IV) de amónio (CAN).

A ligação de ácido cafeico aos filmes de quitosana e filmes híbridos de quitosana com (3-cloropropil)trimetoxissilano (CPTMS), com recurso tanto a KPS como a CAN, deu origem a filmes com baixa capacidade antioxidante. No entanto, a ligação de ácido cafeico à quitosana em solução aquosa de ácido acético 5%, utilizando CAN 60 mM, e posterior formação dos filmes, revelou ser a melhor metodologia para a produção de filmes com actividade antioxidante. Estes filmes foram neutralizados com NaOH e reduzidos com NaBH_4 com o intuito de aumentar a sua actividade antioxidante. Os filmes de quitosana com ácido cafeico neutralizados apresentaram uma actividade 40% superior em relação aos filmes de quitosana. No entanto, a redução dos filmes não revelou ser vantajosa no incremento da actividade antioxidante.

Como se pretendia que os filmes fossem insolúveis em meio ácido, procedeu-se à adição de *genipin*, um composto natural que tem a função de *crosslinker*, pois tem a capacidade de ligar simultaneamente duas cadeias de quitosana, evitando que o filme se solubilizasse em meio ácido. A adição do *genipin* permitiu obter filmes com uma perda de massa de apenas 5%, permitindo uma diminuição da solubilidade em cerca de 75% em relação aos filmes de quitosana com ácido cafeico. Os filmes de quitosana com ácido cafeico e *genipin*, para além da reduzida solubilidade, apresentaram também actividade antioxidante 80% superior à do filme de quitosana e 54% à do filme de quitosana com ácido cafeico.

A actividade antioxidante superior e baixa solubilidade dos filmes de quitosana com ácido cafeico e *genipin*, produzidos segundo a metodologia desenvolvida neste trabalho, permite que possam ser testados em vinho como possíveis substitutos da adição de SO_2 .

keywords

Chitosan, *crosslinking*, *genipin*, *grafting*, caffeic acid, antioxidant activity, FTIR

abstract

Chitosan is a polysaccharide composed by D-glucosamine and, in a small number, by N-acetyl-D-glucosamine residues in β -1,4 linkages. This polysaccharide has the ability to form films with antioxidant capacity but that are soluble in acid solutions.

In this work, a methodology was developed to produce chitosan films with antioxidant activity and insoluble in acid solutions in order to be applied in the vinification process as a substitute of sulfur dioxide

With this aim, a methodology was optimized to link caffeic acid, a phenolic compound with antioxidant activity, to chitosan, by a radical mechanism using as oxidant agents, potassium persulfate (KPS) and ammonium hexanitrocerate (IV) (CAN). The linkage of caffeic acid to chitosan and (3-chloropropyl)trimethoxysilane (CPTMS) hybrid films using both KPS and CAN gave origin to films with very low antioxidant activity. However, when the reaction of caffeic acid and chitosan was performed in aqueous solution of 5% acetic acid, using CAN 60 mM, the films formed presented antioxidant activity. In order to increase their antioxidant activity, these films were neutralized with NaOH and reduced with NaBH₄. The neutralized films prepared with caffeic acid presented 40% higher activity than those prepared only with chitosan. However, the reduction of the films did not increment their antioxidant activity.

In order to prepare films insoluble in acid medium, genipin, a natural compound with chitosan crosslinking capacity, was added. The use of genipin allowed to obtain films that only loss 5% of their mass in wine model solutions. When compared with the films of chitosan and caffeic acid, it represents a decrease of 75% in films solubility. These films prepared with chitosan, caffeic acid and genipin presented also an antioxidant capacity 80% higher than that observed for the films prepared only with chitosan and 54% than the films prepared with chitosan and caffeic acid.

The higher antioxidant activity and lower solubility in acid solutions of the films prepared with chitosan, caffeic acid and genipin allows their use in wine as possible substitutes of sulfur dioxide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

C2 – carbono 2

C3 – carbono 3

C6 – carbono 6

Caf – ácido cafeico

CAN – hexanitrocerato (IV) de amónia

CPTMS – (3-cloropropil)trimetoxissilano

Cu^+ – catião cobre (I)

E° – potencial de redução padrão

Fe^{3+} – catião ferro (III)

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

GA – grau de acetilação

HSO_3^- - ião hidrogenossulfito

KOH – hidróxido de potássio

KPS – persulfato de potássio

Me – grupo metilo

N_2 – azoto

NaBH_4 – boro-hidreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

$-\text{NH}_2$ – grupo amina

NH_3 – amoníaco

$-\text{NH}_3^+$ – grupo amina protonado

pKa – constante de acidez

Q – filme de quitosana

QCaf – filme de quitosana com ácido cafeico

QCafG – filme de quitosana com ácido cafeico e *genipin*

QG – filme de quitosana com *genipin*

rpm – rotações por minuto

SO_2 – dióxido de enxofre

ÍNDICE

Júri

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas e Símbolosi

Índice ii

Capítulo 1 – Introdução3

1.1. Quitina e Quitosana3

1.1.1. Estrutura e Propriedades Químicas4

1.1.2. Propriedades Biológicas da Quitosana5

1.1.3. Modificações Químicas da Quitosana8

Organossilanos9

Genipin10

Grafting14

1.1.4. Aplicações da Quitosana16

1.2. Sulfitos no Vinho – Uma problemática a resolver18

1.3. Relevância do trabalho19

Capítulo 2 – Material e Métodos.....23

2.1. Preparação de filmes de quitosana23

2.2. Preparação de filmes híbridos de quitosana e (3-cloropropil)trimetoxissilano (CPTMS)

.....23

2.3. *Grafting* de ácido cafeico aos filmes24

2.4. *Grafting* de ácido cafeico a quitosana em solução25

2.4.1. Tratamento com NaOH26

2.4.2. Tratamento com NaBH₄26

2.5. *Crosslinking* de *genipin* à quitosana com *grafting* de ácido cafeico28

2.6. Avaliação da actividade antioxidante dos filmes28

2.7. Avaliação da solubilidade dos filmes em solução matriz de vinho.....29

2.8. Determinação da Humidade	30
2.9. Caracterização dos filmes por FTIR.....	30
2.10. Análise Estatística	30
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	33
3.1. Optimização da preparação de filmes de quitosana com <i>grafting</i> de ácido cafeico.....	33
3.1.1. Filmes de quitosana e filmes híbridos de quitosana com CPTMS	33
3.1.2. Solução de quitosana	35
3.2. <i>Crosslinking</i> de <i>genipin</i> à quitosana com <i>grafting</i> de ácido cafeico em solução	40
3.2.1. Actividade Antioxidante.....	41
3.2.2. Solubilidade.....	43
3.2.3. Validação da proposta de filme de quitosana insolúvel em meio ácido e com actividade antioxidante	45
3.3. Caracterização dos filmes por FTIR.....	46
Capítulo 4 – Conclusão	51
Capítulo 5 – Trabalho Futuro	55
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas.....	59

Capítulo 1 – Introdução

Capítulo 1 – Introdução

Os polissacarídeos estão largamente distribuídos na Natureza e têm sido principalmente considerados materiais estruturais e fornecedores de energia. Tem havido também uma tendência para considerar estes biopolímeros menos importantes do que outros, como as proteínas e os ácidos nucleicos, em relação às suas funções biológicas. No entanto, cada vez mais os polissacarídeos têm vindo a atrair maior atenção tanto pelas suas inerentes actividades biológicas como pelas suas propriedades físico-químicas, as quais têm vindo a ser cada vez mais compreendidas [1].

O uso de biopolímeros naturais, nomeadamente polissacarídeos, para aplicações diversificadas nas ciências da vida acarreta grandes vantagens, dada a grande disponibilidade de recursos naturais agrícolas ou marinhos ricos nestes compostos, a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitindo uma grande versatilidade de aplicações ecologicamente sustentáveis [2].

1.1. Quitina e Quitosana

Dos muitos polissacarídeos existentes, a celulose e a quitina são os polissacarídeos estruturais mais abundantes. A quitina é sintetizada por um grande número de organismos vivos e existe principalmente na cutícula do exosqueleto de artrópodes, endosqueletos de lulas e potas (estiletes) ou nas paredes celulares de fungos e leveduras. As principais fontes comerciais de quitina têm sido os exosqueletos de lagosta, camarão e caranguejo [3].

Na Figura 1 está representada a estrutura hierárquica da cutícula do exosqueleto de um crustáceo que demonstra uma estrutura organizada de quitina.

A quitina não é tóxica nem alergénica e tem múltiplas aplicações, sendo ela e os seus derivados aplicáveis em diferentes áreas desde a cromatografia à alimentação, passando pela farmacêutica e fotografia. Este biopolímero tornou-se muito interessante comercialmente também pelo seu alto teor em azoto (6,89%), comparado com a celulose sinteticamente substituída (1,25%) [4], que lhe confere propriedades específicas e consequentemente aplicações diversificadas.

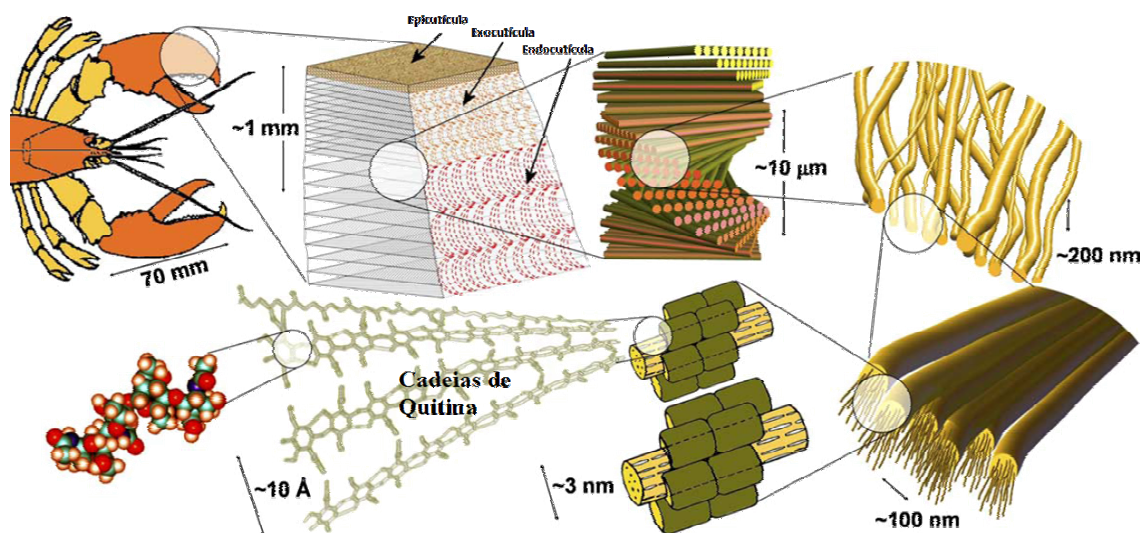


Figura 1 – Estrutura hierárquica da cutícula do exosqueleto de um crustáceo (adaptado de Raabe *et al.* [5]).

1.1.1. Estrutura e Propriedades Químicas

Quimicamente, a quitina é estruturalmente semelhante à celulose, com uma diferença no carbono 2 onde o grupo hidroxilo da celulose é substituído por um grupo acetamida na quitina. Assim, a quitina é um polímero linear de resíduos de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (N-acetil-D-glucosamina) com ligações β -1,4 [1] (Figura 2).

À semelhança da celulose, a presença de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares nas cadeias de quitina causam uma forte insolubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos [6], o que traz muitas limitações no desenvolvimento de novos processos de transformação e aplicações da quitina [3].

A quitina pode dar origem à quitosana, que é o seu derivado mais importante, através da desacetilação. Esta desacetilação é realizada geralmente com recurso a soluções alcalinas fortes (NaOH ou KOH 45%) e a temperaturas altas (acima de 100 °C) [7]. Dependendo da origem e do processo de fabrico, as propriedades e composição da quitosana variam em relação ao grau de acetilação (GA) e massa molecular [8]. Na Figura 2 está representada a reacção de desacetilação da quitina com formação da quitosana.

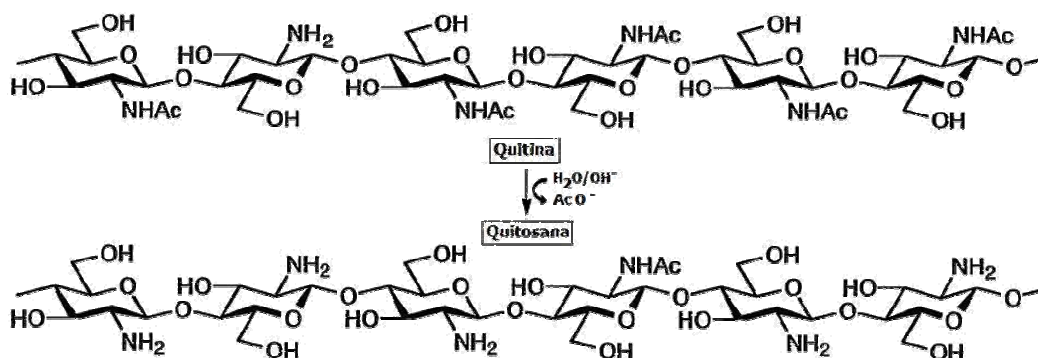


Figura 2 – Reacção de desacetilação da quitina com formação da quitosana (adaptado de Kurita [1]).

Ac: $-\text{COCH}_3$

A quitina tem normalmente um GA de 90% e no final do processo de desacetilação ainda restam 5-15% de grupos acetilamida na cadeia polimérica [6]. Quando o GA da quitina é inferior a 50%, designa-se o polímero por quitosana. Esta é solúvel em soluções ácidas diluídas, com pH abaixo de 6,0, pelo que a quitosana pode ser considerada uma base por possuir grupos amina primários com um valor de pKa de 6,3. A quitosana é então um copolímero de resíduos de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. A sua solubilização ocorre pela protonação do grupo $-\text{NH}_2$ do C2 dos resíduos de D-glucosamina, em que o polissacarídeo é convertido num polieletrólito em meio ácido. Devido a isto, a quitosana é um polímero catiónico pseudonatural que, tal como a quitina, está na base do surgimento de muitas aplicações [3].

1.1.2. Propriedades Biológicas da Quitosana

Várias propriedades biológicas foram já descritas para a quitosana. A quitosana é biodegradável e biocompatível, pois apesar de não estar presente nos mamíferos, pode ser degradada *in vivo* por várias enzimas proteolíticas como a lisozima e a pepsina. A sua biodegradação leva à libertação de oligossacarídeos de comprimento variável, podendo levar à incorporação de glucosamina em glicoproteínas [7], já que a glucosamina é um componente natural das glicoproteínas encontradas no tecido conjuntivo e nas mucosas gastrointestinais. Este monossacarídeo está também envolvido na formação das unhas, tendões, pele, olhos, ossos, ligamentos e válvulas cardíacas [4].

A quitosana, em testes *in vitro*, tem actividade hemostática (coagulante), ou seja, capacidade de deter uma hemorragia. Esta propriedade parece estar relacionada com as cargas positivas deste polímero [7].

O efeito analgésico da quitosana foi também descrito, sendo sugerido que o mecanismo principal deste efeito é a remoção de prótons da zona inflamada. Devido à natureza policationica da quitosana, os grupos amina primários livres podem protonar e o aumento do pH é a principal causa do efeito analgésico [9].

À quitosana foram também atribuídas propriedades anti-colesterolémicas, uma vez que a presença do grupo amina na sua estrutura determina a existência de uma força eletrostática entre a quitosana e aniões, tais como ácidos gordos e ácidos biliares ao nível do aparelho digestivo. Existe um estudo que propõe a formação espontânea de sais insolúveis de quitosana a partir de ácidos biliares hidrofóbicos, cuja natureza deverá permitir a recolha de colesterol e lípidos através de interacções hidrofóbicas [10]. Outro mecanismo aponta para a adsorção da quitosana à superfície da emulsão lipídica e para a formação de uma camada protectora de quitosana que possa impedir as lipases de se ligarem à superfície das micelas e de aceder ao seu interior [11].

A propriedade antimicrobiana também faz parte do conjunto de propriedades da quitosana. Dois mecanismos principais foram sugeridos como a causa da inibição do crescimento das células microbianas por parte deste polissacarídeo. A interacção do polímero policationico com os grupos aniónicos na superfície de células microbianas Gram-negativas provoca a formação de uma camada impermeável em torno da célula, o que impede o transporte de substâncias essenciais para o seu interior, provocando assim a sua morte. Este efeito foi observado em condições ligeiramente ácidas nas quais a quitosana está protonada, podendo no entanto ser reversível se houver um aumento de pH [12]. Outro mecanismo proposto para a acção antimicrobiana é o de que a quitosana pode inibir o crescimento microbiano actuando como um agente quelante de metais, oligoelementos ou nutrientes essenciais e que por isso ficam indisponíveis para que o microrganismo cresça ao ritmo normal. A quitosana também é capaz de interagir com as proteínas e provocar a sua floculação. Esta acção é dependente do pH, tanto para a carga da quitosana como para a carga das próprias proteínas [13]. Pode dizer-se que há um consenso em relação ao motivo pelo qual a quitosana tem esta capacidade antimicrobiana, uma vez que essa é atribuída por muitos autores ao número de grupos -NH_3^+ existentes nas cadeias de quitosana, embora isso também dependa do microrganismo em causa [14].

Além de todas as propriedades já referidas, a capacidade antioxidante deste biopolímero também foi descrita. Uma quitosana com GA inferior exhibe maior actividade

antioxidante pois permite uma maior complexação com os metais [15]. No geral, os antioxidantes são moléculas que têm uma grande facilidade de se oxidar e que, por isso, impedem a oxidação de outros compostos que possam estar presentes em meios que contenham agentes formadores de radicais livres. Os antioxidantes podem inibir as reacções radicalares em cadeia, por exemplo, por eliminação directa de espécies reactivas de oxigénio e por quelação de iões metálicos como o Fe^{3+} ou o Cu^+ (participantes na reacção de *Fenton*) [16]. A propensão de um composto para ceder electrões e, por isso, se oxidar, é medida pelo potencial de redução (E°). Quanto menor for o potencial de redução, maior é a propensão de um dado composto para se oxidar e, por isso, poder actuar como antioxidante. A capacidade antioxidante pode ser medida de várias formas, entre elas, pelo método espectrofotométrico do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Neste método, o radical monocatiónico de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ é inicialmente gerado por oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio originando um cromóforo azul esverdeado, que depois é reduzido na presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ou de electrões (Figura 3). Esta redução provoca uma descoloração que é traduzida como a percentagem de inibição do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e que, por isso, é proporcional à concentração do antioxidante [17]. Os compostos fenólicos são um dos grupos principais de antioxidantes naturais. A sua actividade antioxidante está relacionada com a estrutura molecular, mais precisamente com a presença e com o número de grupos hidroxilo e com os efeitos de conjugação e de ressonância dos seus electrões [16].

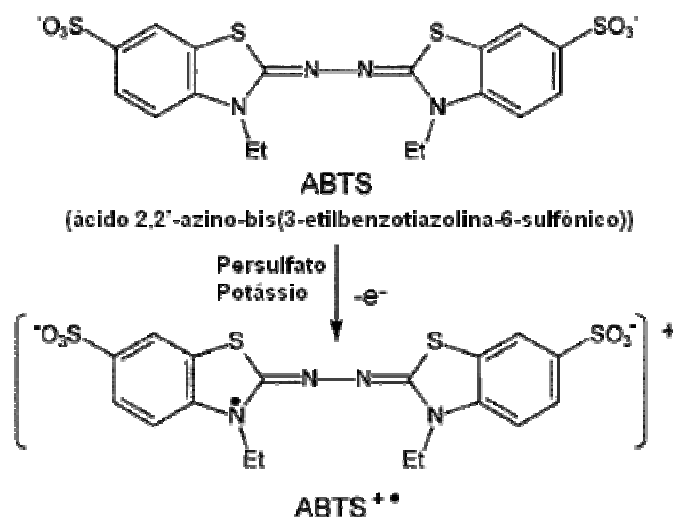


Figura 3 – Formação do catião radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (adaptado de Pannala *et al.* [18]).

1.1.3. Modificações Químicas da Quitosana

As propriedades das soluções de quitosana não dependem apenas do seu GA mas também da distribuição dos grupos acetilo ao longo da cadeia e da massa molecular desta [3]. À parte do grupo amina já referido, este biopolímero possui dois grupos hidroxilo (um secundário no C3 e um primário no C6) onde podem ocorrer modificações químicas que permitem alterar algumas propriedades da quitosana, tal como a solubilidade. Os locais onde podem ocorrer reacções na quitosana estão representados na Figura 4a.

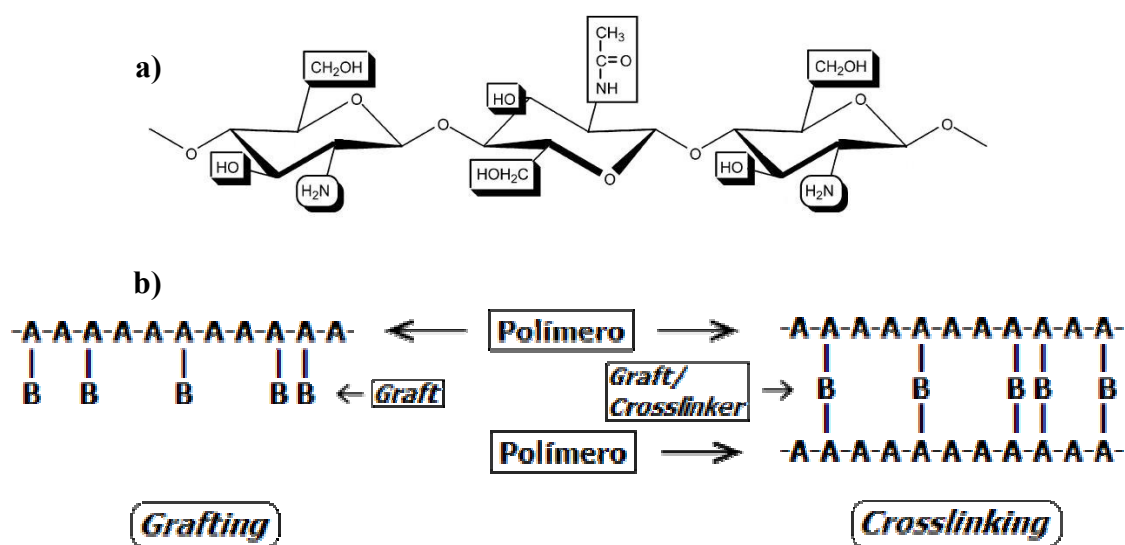


Figura 4 – Reactividade da quitosana. a) Locais da quitosana onde podem ocorrer reacções (adaptado de Pillai *et al.* [6]) e b) Representação esquemática de *grafting* e *crosslinking*.

O grupo -NH_2 confere à quitosana a possibilidade de ocorrência de reacções tais como acetilação, quaternização, reacções com aldeídos e cetonas (que originam bases de Schiff), alquilação ou quelação de metais, permitindo a obtenção de uma grande variedade de produtos [19].

A modificação química da quitosana é importante para a produção de materiais funcionais [20]. Métodos bem conhecidos para a modificação da quitosana como *grafting* (ligação de enxertos) e *crosslinking* (reticulação polimérica) representam vias muito convenientes e eficazes para alterar as propriedades físicas, químicas e mecânicas deste biopolímero para melhorar os usos práticos [21]. A Figura 4b apresenta de uma forma simplificada a diferença entre *grafting* e *crosslinking* de um polímero.

Quando se trata de *grafting*, o enxerto (B) está ligado a apenas um polímero. De início, B pode ser apenas uma molécula, mas podem ligar-se a ela outras moléculas iguais e formar uma pequena cadeia de baixa massa molecular. Passamos a ter o caso do *crosslinking* quando a molécula ou cadeia B serve de ponte na ligação de duas ou mais moléculas de polímero A [22].

Quando temos cadeias de quitosana extensamente ligadas por *crosslinking*, as suas propriedades são muito diferentes das do polímero inicial. A reticulação do polímero leva à formação de uma rede covalente tridimensional permanente que pode permitir a difusão de água e materiais bioactivos e melhorar as propriedades do polímero. Consoante o tipo de *crosslinker*, os poros da malha tridimensional do polímero reticulado variam.

A biocompatibilidade destas quitosanas modificadas não está bem assegurada quando se utilizam *crosslinkers* tóxicos, como é o caso do glutaraldeído (1,5-pentanodial), que é neurotóxico, ou o glioxal (etanodial), que é mutagénico [21]. Portanto, mesmo que estes polímeros reticulados com estes *crosslinkers* sejam purificados antes da aplicação, a possível presença de dialdeídos que não tenham reagido no produto final não pode ser completamente excluída [22]. Por isso, outros *crosslinkers* muito menos tóxicos do que estes, como os derivados do silano, em especial os organossilanos [23-26] ou o *genipin* [22, 27-29], têm vindo a ser usados.

Organossilanos

Os organossilanos têm grande aplicação devido à sua dupla funcionalidade, uma vez que combinam a versatilidade funcional dos compostos orgânicos com a estabilidade dos compostos inorgânicos. A estrutura química dos organossilanos pode traduzir-se genericamente por X_3SiRY , em que X representa, geralmente, grupos alcóxido hidrolisáveis (por exemplo, $-OMe$) e RY representa grupos alquilo (R) ligados a átomos electronegativos (Y) como, por exemplo, o cloro. Estes grupos RY são grupos organofuncionais com estabilidade hidrolítica. De um lado da molécula de organossilano pode ser estabelecida uma ligação química com um material inorgânico por meio dos grupos alcóxido X e do outro lado o grupo organofuncional RY permite uma interacção com o polímero de quitosana [30]. Na figura 5 está representado o exemplo de um organossilano, o (3-cloropropil)trimetoxissilano (CPTMS).

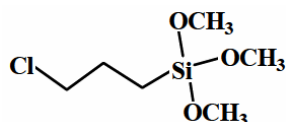


Figura 5 – Estrutura química do (3-cloropropil)trimetoxissilano (CPTMS) (Bartkowiak *et al.* [31]).

Os grupos alcóxido dos organossilanos são transformados em grupos hidroxilo por hidrólise que, por estarem ligados ao átomo de silano, são chamados de silanóis ($-\text{Si}(\text{OH})_3$) e que podem sofrer reacções de condensação originando polissiloxanos ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$) [30]. A Figura 6 representa a reacção do CPTMS com a quitosana.

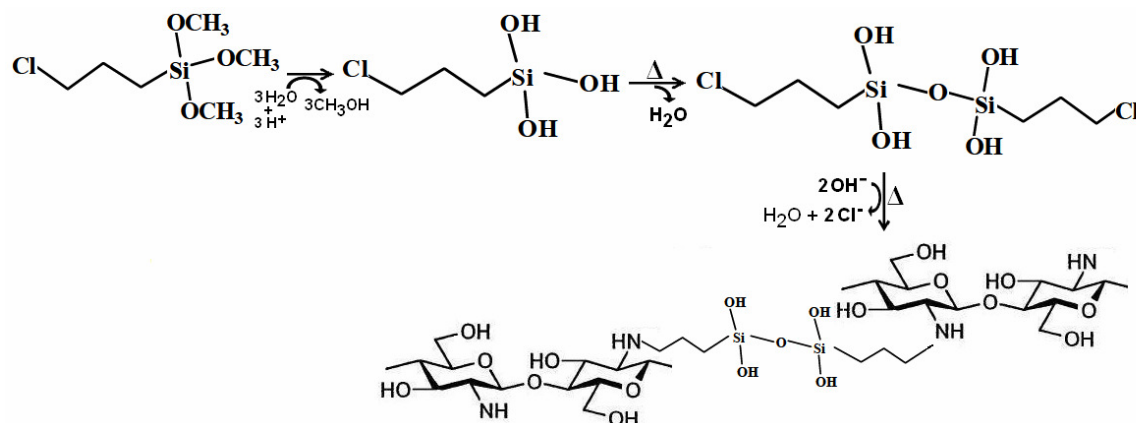


Figura 6 – Reacção química do CPTMS com a quitosana.

Genipin

O *genipin* é um *crosslinker* para a quitosana que tem vindo a ser muito usado. Este composto é a aglucona do genipósido presente no fruto de *Gardenia* (originária da China) e de *Genipa americana* (originária da América do Sul e México) [32]. Na Figura 7 estão representadas as estruturas do genipósido e do *genipin*.

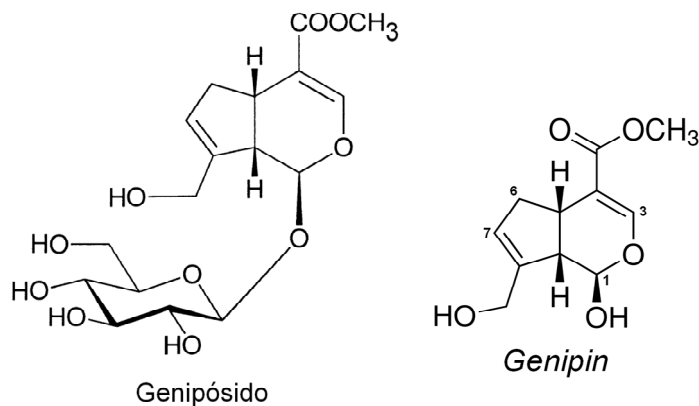
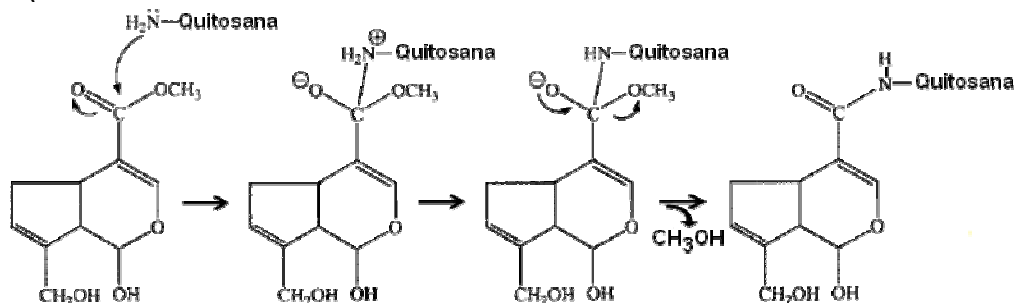


Figura 7 – Estrutura química do genipósido [32] e do *genipin* [33].

Este *crosslinker* é conhecido por reagir rapidamente com grupos amina dos aminoácidos e proteínas, originando pigmentos azuis que são usados como corante natural alimentar [34]. Muitos estudos têm surgido sobre o uso do *genipin* como *crosslinker* para a quitosana [27, 28, 35, 36], por este ser menos citotóxico, como por exemplo cerca de 5000 a 10000 vezes menos do que o glutaraldeído [36].

O *genipin* pode ligar-se covalentemente à quitosana por três mecanismos diferentes. No primeiro mecanismo (Figura 8), a ligação do *genipin* à quitosana acontece por duas reacções diferentes. Na Reacção 1 existe uma substituição nucleofílica S_N2 que envolve a substituição do grupo éster na molécula de *genipin* por uma ligação amida secundária [27]. A ligação da outra molécula de quitosana ocorre, tal como se apresenta na Reacção 2 da Figura 8, inicialmente com um ataque nucleofílico ao átomo de carbono 3 do *genipin* por parte do grupo amina primária da quitosana, originando a formação de um grupo aldeído intermediário. A abertura do anel é seguida por um ataque da amina secundária, formada na primeira etapa da reacção, ao grupo aldeído resultante. Um composto heterocíclico é assim formado incluindo o átomo de azoto do resíduo de glucosamina da quitosana [35].

Reacção 1



Reacção 2

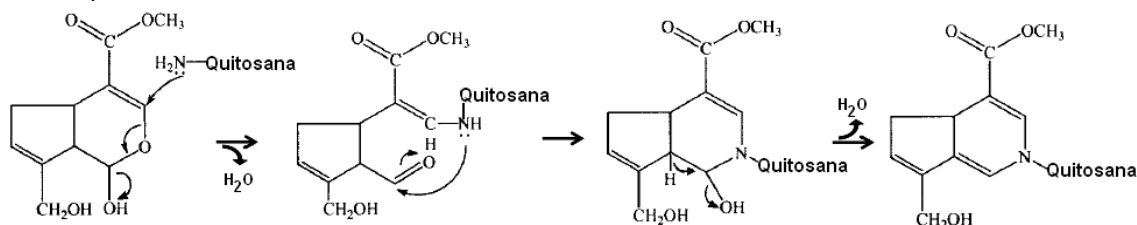


Figura 8 – Reacções de ligação do *genipin* à quitosana pelo mecanismo 1 (adaptado de Butler *et al.* [35]).

A Figura 9 mostra a estrutura resultante do *crosslinking* do *genipin* à quitosana pelo mecanismo 1.

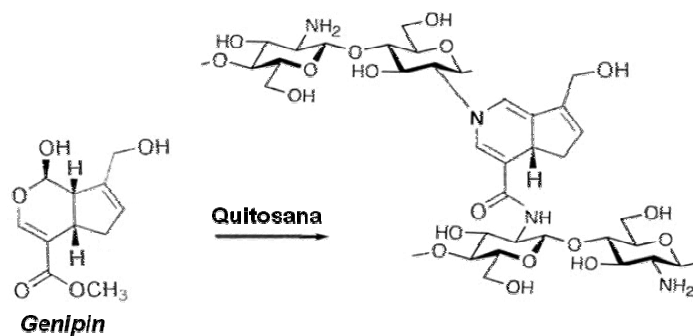


Figura 9 – Estrutura resultante do *crosslinking* do *genipin* à quitosana pelo mecanismo 1 (adaptado de Muzzarelli [33]).

O segundo mecanismo sugerido (Figura 10) do *crosslinking* de *genipin* com a quitosana é iniciado também, tal como descrito no primeiro mecanismo, pelo ataque nucleofílico da Reacção 2 da Figura 8.

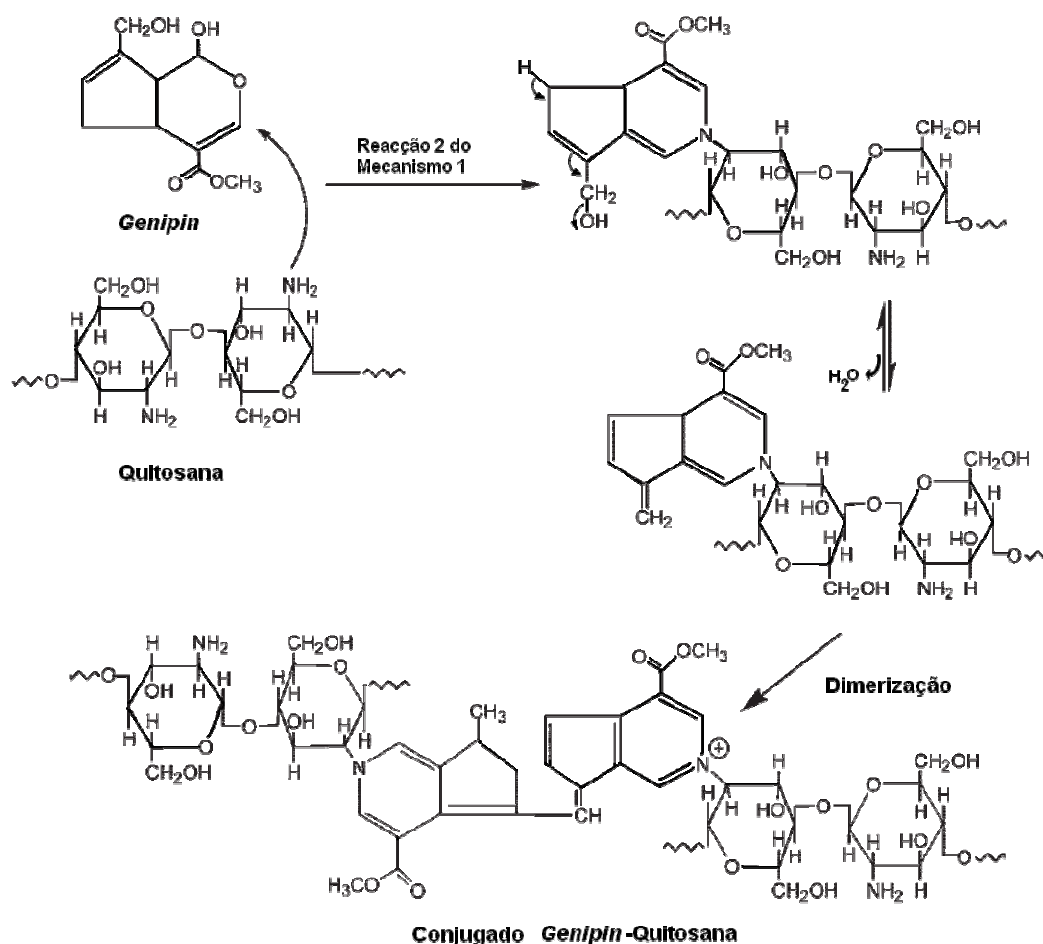


Figura 10 – Mecanismo 2 de *crosslinking* do *genipin* com quitosana (adaptado de Chen *et al.* [27]).

As diferenças deste mecanismo para o primeiro começam quando o anel heterocíclico formado sofre desidratação e origina intermediários aromáticos. Os passos seguintes envolvem polimerização dando origem a derivados heterocíclicos altamente conjugados de *genipin* com quitosana. Por fim, podem estabelecer-se ligações amida secundárias por reacção do grupo éster do *genipin* com o grupo amina da quitosana, tal como já foi mostrado na Reacção 1 da Figura 8, conduzindo à formação de uma rede polimérica [27].

Além dos dois mecanismos descritos anteriormente, foi descrito por Mi *et al.* [36] que os intermediários referidos no mecanismo da Figura 10 se podem associar e originar dímeros, trímeros ou tetrámeros de uma cadeia de quitosana ligada a uma molécula de *genipin* (monómero), em que o *genipin* é sempre o ponto de ligação entre os monómeros (Figura 11).

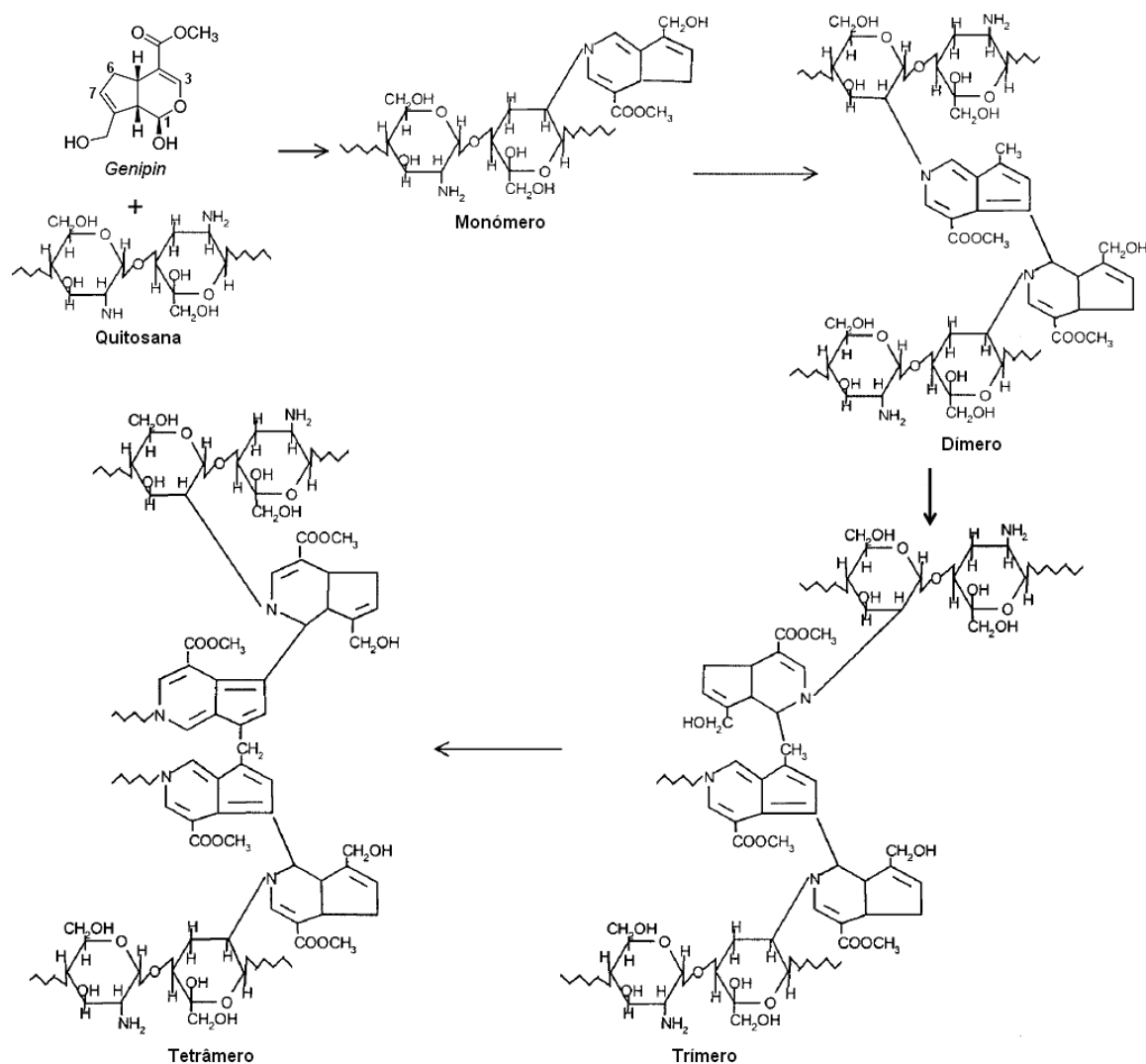


Figura 11 – Mecanismo 3 de *crosslinking* de *genipin* com quitosana (adaptado de Mi *et al.* [36]).

Neste mecanismo, as ligações entre a quitosana e o *genipin* ocorrem preferencialmente como na Reacção 2 apresentada na Figura 8 e, posteriormente, a ligação entre as várias moléculas de *genipin* para originar dímeros, trímeros e tetrâmeros ocorre entre os carbonos 6 de uma molécula e o carbono 1 de outra molécula de *genipin* [36].

Grafting

Vários autores têm acrescentado moléculas por *grafting* à quitosana ou à quitosana já reticulada com o *crosslinker* para assim melhorarem as propriedades desta em relação à quitosana inicial. O *grafting* da quitosana permite a formação de derivados funcionais pela ligação covalente de uma molécula, o *graft* (enxerto), à cadeia principal de quitosana, obtendo-se assim materiais híbridos constituídos por polissacarídeos e outras moléculas. As características do enxerto podem ser alteradas depois deste estar ligado à cadeia de quitosana e com isso melhorar as suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e de agente quelante. As propriedades do copolímero obtido por *grafting* podem ser controladas pela estrutura molecular, comprimento e número de cadeias laterais ligadas ao polímero de quitosana [37].

O *grafting* da quitosana já foi tentado por vários métodos, tais como, por mecanismo radicalar recorrendo a um agente oxidante [38, 39], uso de radiação γ [37] ou uso de enzimas [40]. De entre os agentes oxidantes mais usados, encontram-se o persulfato de potássio (KPS) e o hexanitrocerato (IV) de amónia (CAN). Estes reagentes utilizam-se para ligar moléculas que possuam ligações vinílicas [41], como por exemplo o ácido cafeico (Figura 12), conferindo, neste caso, maior capacidade antioxidante ao polímero [38].

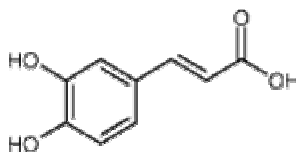


Figura 12 – Estrutura química do ácido cafeico.

O KPS é um potencial iniciador de radicais livres em que a reacção de *grafting* ocorre em dois passos com o mecanismo de transferência de electrões, seguido de propagação. O KPS normalmente sofre degradação térmica gerando radicais livres

aniónicos de persulfato ($S_2O_8 \rightarrow 2SO_4^{\cdot -}$) que, em seguida, vão atacar os grupos amina da quitosana originando radicais, como é demonstrado na Figura 13.

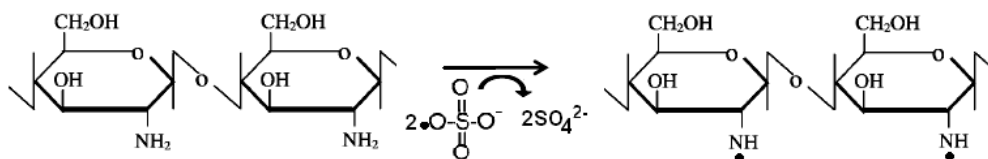


Figura 13 – Formação de radicais na quitosana pelo KPS (adaptado de Prashanth *et al.* [20]).

No entanto, uma das desvantagens do uso deste agente oxidante é que também pode causar a ruptura da ligação glicosídica, destruindo a estrutura da quitosana (Figura 14). Por esta razão, a quantidade de persulfato de potássio necessária para que ocorra a formação de multi- radicais para a co-polimerização sem que ocorra destruição da cadeia polimérica da quitosana por quebra das ligações glicosídicas tem de ser otimizada [42].

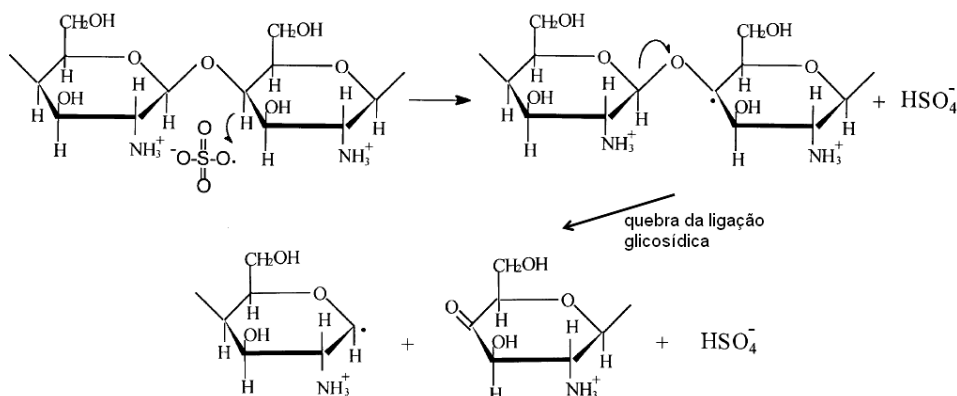
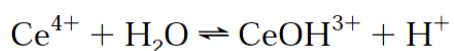


Figura 14 – Ruptura da ligação glicosídica da quitosana por acção do KPS (adaptado de Hsu *et al.* [42]).

Outro agente oxidante utilizado especialmente no *grafting* de monómeros vinílicos é o hexanitrocerato (IV) de amónia (CAN). Em solução aquosa o complexo CAN está em equilíbrio tal como mostra a seguinte reacção química:



Na Figura 15 está representada a reacção entre a quitosana e o CAN, onde se pode ver que o Ce^{4+} forma um complexo com os resíduos de glucosamina que, ao serem quebrados, originam um radical no carbono 2 e/ou no carbono 3.

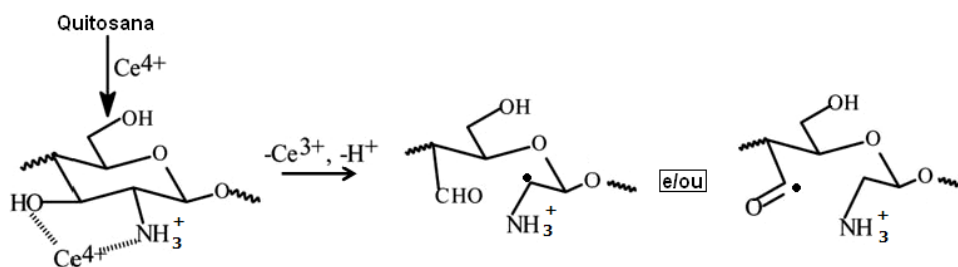


Figura 15 – Reacção química entre a quitosana e o CAN (adaptado de Zohuriaan-Mehr [43]).

Os radicais formados na quitosana combinam-se com os electrões das ligações vinílicas formando ligações covalentes entre a quitosana e o *graft*. A Figura 16 representa o *grafting* de ácido cafeico à quitosana quando o agente oxidante é o CAN [43].

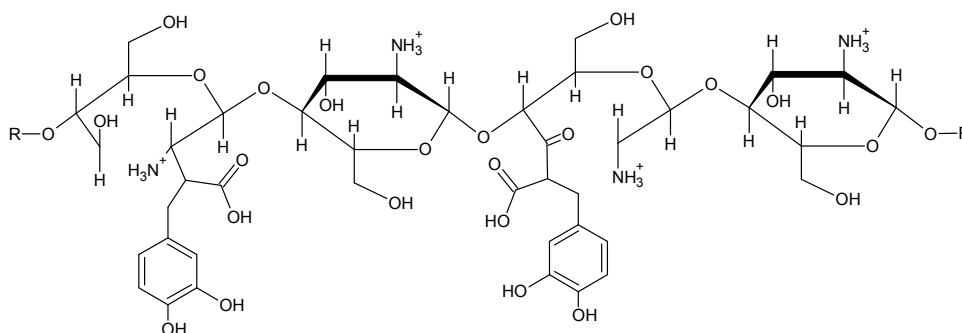


Figura 16 – *Grafting* de ácido cafeico a quitosana com recurso a CAN.

1.1.4. Aplicações da Quitosana

Devido às propriedades já descritas, muitas aplicações para a quitosana têm vindo a surgir.

Na área das ciências biomédicas, a quitosana tem vindo a ser usada na cura de ferimentos, como por exemplo queimaduras. Como a quitosana consegue formar filmes permeáveis à água e ao oxigénio e são biocompatíveis, estes podem ser formados directamente na queimadura por aplicação de uma solução aquosa de acetato de quitosana que, por acção da lisozima (enzima presente naturalmente na pele e capaz de degradar a quitosana), são naturalmente destruídos sem terem de ser retirados e sem, por isso, se correr o risco de danificar o tecido renovado [44]. Outra aplicação da quitosana nesta área é como sistema de distribuição controlada de fármacos, tanto na forma de nanopartículas e microesferas, como na forma de hidrogéis, filmes e comprimidos [7]. O uso da quitosana como vector não-viral para o transporte de genes tem vindo a ser testado e oferece várias vantagens em relação aos vectores virais. A principal vantagem é que a quitosana não

produz recombinação endógena, efeitos oncológicos ou reacções imunológicas, além destes complexos de quitosana poderem ser preparados com baixos custos [7]. Por fim, também devido à sua biodegradabilidade e porosidade controladas, as matrizes de quitosana são materiais promissores para a concepção de sistemas de engenharia de tecidos regenerativos onde a quitosana tem vindo a ser utilizada como suporte para cultura, apoio e organização de tecidos danificados.

Além das aplicações da quitosana nas ciências biomédicas também têm vindo a surgir aplicações industriais. Uma aplicação nesta área é em biocatálise, na qual a quitosana é utilizada como suporte à imobilização de enzimas, células, organelos ou outras estruturas complexas [7].

Também no tratamento de águas residuais se tem recorrido ao uso de quitosana. A contaminação química da água por uma vasta gama de produtos tóxicos, como metais, moléculas aromáticas e corantes, entre outros, é um grave problema ambiental devido à potencial toxicidade destes compostos. O uso de polímeros de baixo custo, como a quitosana, para remover poluentes da água é de grande interesse. Este polímero tem sido usado para remover uma grande variedade de compostos, como contaminantes negativamente carregados (nitratos e fosfatos), compostos orgânicos e metais pesados, de águas residuais [45, 46], incluindo a aquacultura [47].

As aplicações industriais alimentares são das mais importantes devido às suas propriedades biológicas, descritas em 1.1.2, sendo usada como conservante, antioxidante, fibra dietética e agente emulsionante [48]. Muitos estudos têm surgido para o uso da quitosana como adjuvante tecnológico, por exemplo, como agente clarificante, controlador de acidez e do acastanhamento enzimático em sumo de frutas [49], e para evitar o acastanhamento em vinho branco [50]. É também utilizado como aditivo, como substituto de nitritos, em carne [51] e enchidos [52] e como emulsionante em leite e queijo [53].

Os revestimentos são muito importantes na área alimentar, pois podem retardar o amadurecimento, a perda de água e reduzir a deterioração dos alimentos, mas podem alterar o sabor dos alimentos. Revestimentos semi-permeáveis e biodegradáveis, tais como revestimentos de quitosana, podem criar uma atmosfera modificada semelhante à atmosfera controlada utilizada em armazenamento, mas a um custo mais baixo e sem alterar o sabor dos alimentos [54]. Tem sido amplamente documentado o uso de filmes de quitosana como revestimento, ou seja, como barreira protectora para aumentar o tempo de

armazenamento de muitos alimentos rapidamente perecíveis, tais como o pão [55], frutas (morangos) [56], legumes (tomate e alface) [56, 57] e ovos [58].

1.2. Sulfitos no Vinho – Uma problemática a resolver

O dióxido de enxofre (SO_2) e as muitas formas de sulfitos inorgânicos (metabissulfito de potássio ou sódio), que libertam SO_2 consoante as condições de utilização, têm sido amplamente utilizados nas indústrias do vinho como conservante. A adição deste composto inibe os processos de descoloração e oxidação, o crescimento de espécies indesejáveis de leveduras e bactérias e as reacções enzimáticas durante a produção e armazenamento do vinho, melhorando assim a sua qualidade e aparência. No entanto, o uso de SO_2 tem de ser controlado, sendo na União Europeia o nível máximo permitido de 160 mg/L para vinho tinto e 210 mg/L para vinho branco ou rosé [59].

A adição de SO_2 ocorre em várias fases do processo de vinificação. O mosto é tratado imediatamente após o esmagamento das uvas para preservar os constituintes que são sensíveis à oxidação, pois evita a oxidação enzimática e elimina microrganismos indesejáveis (bactérias, leveduras e fungos). O tratamento dos vinhos com SO_2 também pode ocorrer depois da fermentação alcoólica para eliminar microrganismos patogénicos. Por fim, a adição de SO_2 ocorre ainda antes do engarrafamento para evitar fenómenos de oxidação no vinho depois de engarrafado e para a segurança microbiológica do produto final, aumentando a sua longevidade [60].

Quando o SO_2 é adicionado ao mosto ou vinho é estabelecido um equilíbrio entre as diversas formas moleculares desse composto. Uma parte reage com alguns compostos presentes no vinho, como acetaldeído, açúcares, antocianas, ácidos cetónicos e urónicos e moléculas dicarbonílicas. A outra parte é chamada de SO_2 livre. A maioria do SO_2 livre está presente sob a forma de hidrogenossulfito (HSO_3^-) [61].

Os sulfitos são seguros para a maioria dos consumidores que consomem alimentos e bebidas que os contêm. No entanto, algumas pessoas sensíveis aos sulfitos podem reagir a estas substâncias com sintomas alérgicos, como broncoespasmos e, além disso, os sulfitos também têm sido dados como os maiores culpados no surgimento de respostas asmáticas desencadeadas pelo consumo de vinho [62]. Estas complicações de saúde tornam o consumo de vinho proibitivo a consumidores que tenham este tipo de reacção alérgica.

De forma a minimizar o impacto dos sulfitos nos consumidores, diferentes métodos têm sido testados para a substituição ou redução dos teores de anidrido sulfuroso na produção e conservação dos vinhos, tais como a adição de dimetildicarbonato [63], uso de lisozima [64], uso de bacteriocinas [65], aplicação de campos eléctricos pulsados [66] e alta pressão hidrostática [67]. No entanto, nenhum destes tratamentos revelou ser eficaz na substituição da adição de SO₂, sendo necessário continuar a estudar metodologias alternativas para a sua substituição nos vinhos.

1.3. Relevância do Trabalho

As características e propriedades da quitosana, em conjunto com o facto de ser possível modificá-la quimicamente, incrementando assim as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, tornam-na num polímero interessante para ser utilizado no vinho com o intuito de reduzir ou mesmo eliminar a adição de SO₂ na vinificação.

Com o trabalho desenvolvido nesta dissertação pretendeu-se desenvolver uma metodologia que permitisse a produção de filmes com base em quitosana mas insolúveis em soluções hidroalcoólicas ácidas, como é o caso do vinho, e com uma actividade antioxidante superior à dos filmes produzidos apenas com quitosana.

Com este objectivo foi estudado o uso de um *crosslinker*, para diminuir a solubilidade dos filmes em soluções ácidas, e de um *graft*, com elevada actividade antioxidante, para aumentar a capacidade antioxidante dos filmes produzidos. Os *crosslinkers* testados na produção dos filmes foram um organossilano (CPTMS) e o *genipin*. Estes compostos foram seleccionados principalmente devido à sua baixa toxicidade. O *graft* usado neste trabalho foi o ácido cafeico devido à sua capacidade antioxidante e também por possuir na sua estrutura carbonos vinílicos que permitiam a ligação à molécula de quitosana por meio radicalar.

Os filmes produzidos foram caracterizados em relação à sua actividade antioxidante e solubilidade em soluções hidroalcoólicas ácidas. Uma caracterização estrutural dos filmes produzidos foi também realizada por espectroscopia de infravermelho (FTIR).

Capítulo 2 – Material e Métodos

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1. Preparação de filmes de quitosana

A solução de quitosana (Aldrich, massa molecular média, de acordo com o fabricante) 1,5% (m/v) foi obtida por dissolução em solução aquosa de ácido acético 5% (v/v), com agitação, durante 16 h à temperatura ambiente. A 50 g de solução de quitosana adicionaram-se 0,4 g de glicerol, como plastificante, e esta mistura foi colocada num banho de água a 50 °C, com agitação, durante 10 min, de modo a promover a sua homogeneização. Após arrefecer até à temperatura ambiente mantendo uma agitação constante (durante 30 min), a solução foi filtrada sob vácuo com um funil de placa porosa (G2), tendo-se seguidamente procedido à sua desgaseificação também por vácuo. Desta solução, foram transferidos 31 g para uma placa de *plexiglass* 12 x 12 cm (com uma área útil de 144 cm²). A placa com a solução foi colocada na estufa num suporte nivelado, onde permaneceu durante 16 h, a 35 °C, para formação do filme por evaporação do solvente. Este filme foi designado por “Q”.

2.2. Preparação de filmes híbridos de quitosana e (3-cloropropil)trimetoxissilano (CPTMS)

Para além dos filmes de quitosana, foram também preparados filmes híbridos de quitosana com CPTMS, por adaptação do método descrito por Shiu *et al.* [38].

A solução de quitosana foi obtida de acordo com o descrito em 2.1, por dissolução em solução aquosa de ácido acético e adição de glicerol. A esta solução adicionaram-se 2 mL de CPTMS (Aldrich, pureza $\geq 97\%$) e deixou-se reagir durante 1 h. A solução foi filtrada, desgaseificada e colocada numa placa de *plexiglass* tal como descrito em 2.1. A placa com a solução foi colocada na estufa durante 2 h a 70 °C. Após este tempo, o filme foi retirado da placa e colocado numa solução de NaOH 1 M durante 1 h e depois foi novamente colocado na estufa a 70 °C, durante 2 h, para completar a substituição nucleofílica alifática. Decorrido esse tempo, retirou-se o filme da estufa, lavou-se abundantemente com água destilada até neutralização e foi deixado a secar à temperatura ambiente. Este filme foi designado por “Q+CPTMS”.

Paralelamente à preparação deste filme híbrido, preparou-se um filme controlo utilizando a mesma metodologia, em que apenas se usou quitosana sem adição de CPTMS, designando-se por “Q_{controloCPTMS}”.

2.3. Grafting de ácido cafeico aos filmes

O *grafting* do ácido cafeico aos filmes foi efectuado por meio radicalar com recurso a agentes oxidantes. Dois agentes oxidantes foram testados: o persulfato de potássio (KPS) e o hexanitrocerato (IV) de amónia (CAN).

Para o KPS (Fluka, pureza $\geq 99\%$) diferentes condições de reacção (concentração de KPS, tempo e temperatura) foram usadas. A 3 mL de uma solução de KPS adicionaram-se 3 cm² de filme e deixou-se reagir durante determinado período de tempo e determinada temperatura, de acordo com a Tabela 1. Depois adicionaram-se 200 µL de uma solução de ácido cafeico (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 95\%$) em etanol 4% (m/v), borbulhou-se com N₂ (g) e deixou-se reagir no escuro, com agitação, a 40 °C durante 3 h.

Tabela 1 – Condições testadas para o *grafting* de ácido cafeico em filmes de quitosana e quitosana com CPTMS com recurso a KPS ou CAN.

Nome do filme	Suporte do <i>grafting</i>	[KPS] (mM)	[CAN] (mM)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
KPS01	Q+CPTMS	2,5	-	30	40
KPS02	Q+CPTMS	2,5	-	10	40
KPS03	Q+CPTMS	0,50	-	10	40
KPS04	Q+CPTMS	0,25	-	30	40
KPS05	Q+CPTMS	0,25	-	60	40
KPS06	Q+CPTMS	0,25	-	10	40
KPS07	Q+CPTMS	0,25	-	10	25
KPS08	Q+CPTMS	0,25	-	10	60
KPS09	Q	0,25	-	10	40
KPS10	Q	0,25	-	10	60
KPS11	Q _{controlo} CPTMS	0,25	-	10	60
CAN01	Q+CPTMS	-	6	60	40
CAN02	Q+CPTMS*	-	6	60	40
CAN03	Q+CPTMS	-	6	0	40

* filme lavado com água destilada depois de reagir com CAN 6 mM antes da adição do ácido cafeico.

O *grafting* de ácido cafeico no filme de Q+CPTMS com recurso ao CAN (BDH, pureza $\geq 98\%$) como agente oxidante foi testado utilizando-se uma solução aquosa de CAN 6 mM. A 2,5 mL desta solução adicionaram-se 3 cm² de filme e deixou-se reagir durante 1 hora a 40 °C. Depois da reacção com CAN, adicionaram-se 200 µL de uma solução de ácido cafeico em etanol 4% (m/v), borbulhou-se com N₂ (g) e deixou-se reagir no escuro, com agitação, a 40 °C durante 3 h. As diferentes condições de reacção (concentração de CAN, tempo e temperatura) usadas estão descritas na Tabela 1.

Efectuou-se ainda um filme (CAN02) semelhante ao CAN01 mas com a diferença de que o filme foi lavado com água destilada depois de reagir com o CAN, para retirar o seu excesso, antes da adição do ácido cafeico.

Foi também feito um filme de Q+CPTMS com *grafting* de ácido cafeico em que se utilizou o procedimento descrito para a preparação do filme CAN01, com a excepção do facto do ácido cafeico ter sido adicionado simultaneamente com o CAN, sendo este filme designado por “CAN03”.

No final do *grafting* todos os filmes foram lavados num extractor de Soxhlet de 60 mL com 130 mL de metanol durante 2 h (12 ciclos/h), para extrair todo o ácido cafeico não ligado à quitosana. Em cada lavagem, usou-se sempre a mesma área de filme (12 cm²).

2.4. *Grafting* de ácido cafeico a quitosana em solução

Em alternativa à adição do ácido cafeico aos filmes, foi também efectuada a adição do ácido cafeico à quitosana ainda em solução (Q_{solução}). A 50 g de solução de quitosana 1,5% (m/v), preparada como descrito em 2.1, juntaram-se 50 mL de solução aquosa de CAN com determinada concentração, tal como discriminado na Tabela 2, e 4 mL de ácido cafeico em etanol 4% (m/v). Esta mistura foi borbulhada com N₂ (g) e foi colocada num banho de água a 40 °C, no escuro, com agitação durante 3 h. Passado este tempo de reacção, adicionaram-se 600 mL de acetona destilada para precipitar a quitosana [39]. De seguida centrifugou-se a 15000 rpm durante 20 min e a 4°C para a separação do precipitado. O precipitado foi colocado em 100 mL de metanol durante 1 h para retirar algum do ácido cafeico não ligado à quitosana e, em seguida, voltou-se a centrifugar como descrito anteriormente. O precipitado foi dissolvido em 45 mL de solução aquosa de ácido acético 5% (v/v). Após completa dissolução foi adicionado glicerol, a solução foi homogeneizada, filtrada, desgaseificada e transferida para uma placa de *plexiglass*, tal como descrito em 2.1. O filme formado foi retirado da placa e lavado num extractor de Soxhlet, tal como descrito no ponto 2.3. Os filmes de quitosana com ácido cafeico obtidos desta forma são designados por “QCafxx”, correspondendo “xx” à designação específica de cada filme, tal como descrito na Tabela 2.

Paralelamente a estes filmes, preparou-se um filme apenas de quitosana (Q_{solução}). Para cada filme, 100 g de solução de quitosana 1,5% (m/v) foi precipitada com 300 mL de acetona destilada. O precipitado foi centrifugado e separado, tal como descrito no

parágrafo anterior, sendo depois colocado em 45 mL de solução aquosa de ácido acético 5% (v/v), com agitação, até completa dissolução. De seguida, procedeu-se como descrito em 2.1 para a obtenção de um filme de quitosana. Filmes de quitosana preparados desta forma foram ou não lavados num extractor de Soxhlet, conforme discriminado na Tabela 2, sendo que em caso afirmativo a lavagem foi efectuada como descrito em 2.3. Os filmes de quitosana obtidos desta forma são designados por “Qxx”, correspondendo “xx” à designação específica de cada filme, tal como descrito na Tabela 2.

2.4.1 Tratamento com NaOH

O tratamento com NaOH consistiu em colocar 3 cm² de filme numa solução de NaOH 1 M durante 1 h. Decorrido esse tempo, os filmes foram lavados abundantemente com água destilada para remoção do NaOH. Estes filmes assim neutralizados foram deixados a secar à temperatura ambiente. Os filmes submetidos a este tratamento correspondem, na Tabela 2, àqueles que têm “Sim” na coluna do “Tratamento com NaOH” e a sua designação é acrescida de “n”.

2.4.2. Tratamento com NaBH₄

Alguns filmes foram também mergulhados numa solução de NaBH₄ 10% (m/v) em NH₃ 3 M durante 1 h, numa proporção de 10 mL de solução para 3 cm² de filme. Decorrido esse tempo, o excesso de NaBH₄ foi removido com água destilada. Estes filmes reduzidos, foram também deixados a secar à temperatura ambiente. Os filmes submetidos a este tratamento correspondem, na Tabela 2, àqueles que têm “Sim” na coluna do “Tratamento com NaBH₄” e a sua designação é acrescida de “r”. Este tratamento, em alguns casos, tal como descrito na Tabela 2, foi acrescentado ao tratamento com NaOH descrito em 2.4.1., sendo neste caso de duplo tratamento, a designação do filme acrescida de “nr”.

Tabela 2 – Condições testadas para o *grafting* de ácido cafeico a quitosana em solução (Q_{solução}) com recurso a CAN.

Nome do filme	Data	[CAN] (mM)	Tratamento com NaOH	Tratamento com NaBH ₄	Genipin	Lavagem Soxhlet	Figura nº
Q01	10 Maio	-	-	-	-	-	18
Q01n		-	Sim	-	-	-	
Q01nr		-	Sim	Sim	-	-	
QCaf01		6	-	-	-	Sim	
QCaf01n		6	Sim	-	-	Sim	
QCaf01nr		6	Sim	Sim	-	Sim	
QCaf02		30	-	-	-	Sim	
QCaf02n		30	Sim	-	-	Sim	
QCaf02nr		30	Sim	Sim	-	Sim	
QCaf03	25 Maio	30	-	-	-	Sim	19
QCaf03n		30	Sim	-	-	Sim	
QCaf03nr		30	Sim	Sim	-	Sim	
QCaf04		60	-	-	-	Sim	
QCaf04n		60	Sim	-	-	Sim	
QCaf04nr		60	Sim	Sim	-	Sim	
Q02	01 Junho	-	-	-	-	-	20
Q02n		-	Sim	-	-	-	
Q02nr		-	Sim	Sim	-	-	
QCaf04		60	-	-	-	Sim	
QCaf04n		60	Sim	-	-	Sim	
QCaf04nr		60	Sim	Sim	-	Sim	
Q03	16 Junho	-	-	-	-	Sim	21
Q03n		-	Sim	-	-	Sim	
Q03nr		-	Sim	Sim	-	Sim	
QCaf05		60	-	-	-	Sim	
QCaf05n		60	Sim	-	-	Sim	
QCaf05nr		60	Sim	Sim	-	Sim	
QCaf03	01 Junho	30	-	-	-	Sim	22
QCaf03n		30	Sim	-	-	Sim	
QCaf03nr		30	Sim	Sim	-	Sim	
QCaf06		30	-	-	-	Sim	
QCaf06n		30	Sim	-	-	Sim	
QCaf06nr		30	Sim	Sim	-	Sim	
Q04	16 Agosto	-	-	-	-	Sim	23, 24 e 25
Q04n		-	Sim	-	-	Sim	
Q04r		-	-	Sim	-	Sim	
QG01		-	-	-	Sim	Sim	
QG01n		-	Sim	-	Sim	Sim	
QG01r		-	-	Sim	Sim	Sim	
QCaf07		60	-	-	-	Sim	
QCaf07n		60	Sim	-	-	Sim	
QCaf07r		60	-	Sim	-	Sim	
QCafG01		60	-	-	Sim	Sim	
QCafG01n		60	Sim	-	Sim	Sim	
QCafG01r		60	-	Sim	Sim	Sim	
Q05		-	-	-	-	Sim	
Q05n		-	Sim	-	-	Sim	
Q05r		-	-	Sim	-	Sim	
QG02	13 Setembro	-	-	-	Sim	Sim	26 e 27
QG02n		-	Sim	-	Sim	Sim	
QG02r		-	-	Sim	Sim	Sim	
QCaf08		60	-	-	-	Sim	
QCaf08n		60	Sim	-	-	Sim	
QCaf08r		60	-	Sim	-	Sim	
QCafG02		60	-	-	Sim	Sim	
QCafG02n		60	Sim	-	Sim	Sim	
QCafG02r		60	-	Sim	Sim	Sim	

2.5. Crosslinking de genipin à quitosana com grafting de ácido cafeico

O *grafting* do ácido cafeico com CAN 60 mM foi efectuado tal como descrito no ponto 2.4. Após completa dissolução do precipitado, adição e homogenização do glicerol, adicionou-se à mistura 250 μ L de solução de *genipin* (Challenge Bioproducts Co, pureza $\geq 98\%$) 10% (m/v) em etanol, de forma a ter uma concentração de 0,05% de *genipin* no filme. A mistura foi deixada a homogeneizar com agitação constante durante 30 min [29]. Decorrido este tempo, filtrou-se, desgaseificou-se e colocou-se na placa, tal como descrito no ponto 2.1. Após 6 h da adição do *genipin*, os filmes foram colocados a secar na estufa a 35 °C, durante 16 h. Este filme de quitosana com ácido cafeico e *genipin* foi depois lavado num extractor de Soxhlet, tal como descrito no ponto 2.3. Os filmes de quitosana com ácido cafeico e *genipin* obtidos desta forma são designados por “QCafGxx”, correspondendo “xx” à designação específica de cada filme, tal como descrito na Tabela 2. A este filme foi também efectuado o tratamento de neutralização com NaOH ou de redução com NaBH₄, tal como descrito em 2.4.1. e 2.4.2., respectivamente.

Para o estudo do *crosslinking* de *genipin* à quitosana com *grafting* de ácido cafeico, além dos filmes de “QCafGxx”, foram sempre preparados, como termo de comparação, filmes apenas de quitosana e de quitosana com ácido cafeico, tal como descritos em 2.4, e filmes apenas de quitosana com *genipin*, utilizando a metodologia descrita no parágrafo anterior, em que a concentração *genipin* no filme foi de 0,05%. O filme de quitosana com *genipin* obtido desta forma é designado por “QGxx”, correspondendo “xx” à designação específica de cada filme, tal como descrito na Tabela 2. A este filme foi também efectuado o tratamento com NaOH ou com NaBH₄.

2.6. Avaliação da actividade antioxidante dos filmes

A actividade antioxidante dos filmes produzidos foi determinada por uma adaptação do método do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS, descrito por Re *et al.* [17].

Preparou-se uma solução de ABTS 7 mM em persulfato de potássio 2,45 mM. Primeiro preparou-se a solução de persulfato e depois dissolveu-se o ABTS nessa solução. Deixou-se esta solução a reagir no escuro, à temperatura ambiente durante 12-16 h, para a formação do ABTS^{•+}. Diluiu-se 1 mL da solução de ABTS^{•+} em 80 mL de etanol. A absorvância a 734 nm desta solução foi medida num espectrofotómetro (Jenway 6405

UV/Vis) e a concentração da solução foi ajustada de modo a ter valores de absorvância entre 0,700 e 0,800.

Um quadrado de filme com 1 cm² de área foi colocado em 1,5 mL de solução de ABTS⁺⁺. Deixou-se reagir no escuro, num agitador orbital a 80 rpm (Lab-line). A absorvância a 734 nm da solução de ABTS⁺⁺ foi medida ao fim de 72 h de reacção (excepto no caso da Tabela 3 e Figura 18, em que a % de inibição foi determinada apenas ao fim de 24 horas). A absorvância da solução de ABTS sem filme foi também medida ao fim de 24 ou 72 h, conforme o caso. Todas as análises foram realizadas em triplicado para cada par filme/tratamento. A actividade antioxidante dos filmes foi determinada pela percentagem de inibição calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times (Ab - Aa) / Ab$$

onde Ab é o valor da absorvância do ABTS⁺⁺ (sem filme) e Aa é o valor da absorvância do ABTS⁺⁺ na presença da amostra (filme), ambos ao fim de 72 h de reacção (excepto no caso da Tabela 3 e Figura 18, em que a % de inibição foi determinada apenas ao fim de 24 horas).

2.7. Avaliação da solubilidade dos filmes em solução matriz de vinho

Os ensaios de solubilidade foram realizados numa solução matriz de vinho, isto é, uma solução 10% etanol com pH 3,5 ajustado com ácido clorídrico. Um quadrado de filme com 2 cm² de área foi pesado e colocado em 30 mL de solução matriz à temperatura ambiente com agitação orbital (80 rpm) durante 7 dias. Ao fim deste tempo, os filmes foram retirados da solução e colocados numa estufa a 105 °C durante 16 h. Os filmes foram retirados da estufa e após arrefecerem até à temperatura ambiente num exsiccador foram pesados.

A solubilidade foi determinada pela percentagem de perda de massa calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ perda de massa} = 100 \times (Mi - Mf) / Mi,$$

onde Mi é a massa de filme seco antes de colocar na solução matriz e Mf é a massa de filme seco após 7 dias na solução matriz de vinho.

Os ensaios de solubilidade foram efectuados em triplicado para cada par filme/tratamento.

2.8. Determinação da Humidade

Colocaram-se cápsulas de vidro na estufa durante 5 h a 105°C e deixaram-se arrefecer num exsicador contendo sílica gel azul, durante 20 min. Pesaram-se as cápsulas e em cada uma foi colocado um quadrado de filme com 4 cm². O conjunto da cápsula e do quadrado de filme foi colocado na estufa a 105°C durante 16 h. Deixou-se arrefecer o conjunto até à temperatura ambiente num exsicador contendo sílica gel azul, durante 20-30 min. Pesou-se cada cápsula com o filme. A percentagem de humidade foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Humidade} = 100 \times (M_i - M_f) / (M_i - M_c)$$

onde M_c é a massa da cápsula sem filme, M_i é a massa inicial do conjunto cápsula-filme antes da secagem e M_f é a massa final do conjunto cápsula-filme depois da secagem. A determinação foi efectuada em triplicado para cada par filme/tratamento.

2.9. Caracterização dos filmes por FTIR

Os espectros de FTIR dos diferentes filmes foram adquiridos na gama de números de onda entre 4000 e 600 cm⁻¹ com uma resolução de 8 cm⁻¹ num espectrómetro Perkin Elmer, Spectrum BX com acessório Golden Gate (sistema de ATR “Attenuated total reflection”, reflexão total atenuada), com a acumulação de 32 scans. A análise dos espectros foi realizada recorrendo ao software CATS desenvolvido por Barros [68] para a análise dos componentes principais (PCA).

2.10. Análise Estatística

Os resultados obtidos para a actividade antioxidante e solubilidade foram avaliados estatisticamente de forma a verificar qual ou quais são significativamente diferentes e para isso foi utilizado os testes F e *t-student* com um nível de significância de 95%. Tal avaliação foi realizada com recurso aos testes F e *t-student* do Microsoft Excel 2003.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

O desenvolvimento dos filmes de quitosana com actividade antioxidante e insolúveis em meio ácido foi realizado em duas fases. Numa primeira fase foi otimizada a ligação do ácido cafeico à quitosana (*grafting*). Nesta optimização foi testado o uso de dois agentes oxidantes, o persulfato de potássio (KPS) e o hexanitrocerato (IV) de amónia (CAN), para a ligação do ácido cafeico, primeiro em filmes de quitosana com e sem (3-cloropropil)trimetoxissilano (CPTMS) e depois em quitosana em solução aquosa de ácido acético. O sucesso na ligação do ácido cafeico à quitosana foi avaliado por determinação da actividade antioxidante dos filmes.

Na segunda fase do trabalho foram preparados filmes com adição de *genipin* (*crosslinker*) às soluções de quitosana com ácido cafeico. A actividade antioxidante destes filmes foi também determinada, assim como a sua solubilidade em solução matriz de vinho (solução hidroalcoólica a pH 3,5).

3.1. Optimização da preparação de filmes de quitosana com *grafting* de ácido cafeico

3.1.1. Filmes de quitosana e filmes híbridos de quitosana com CPTMS

Numa primeira fase, o *grafting* com ácido cafeico foi testado simultaneamente em filmes de quitosana (Q) e filmes híbridos de quitosana com CPTMS (Q+CPTMS). Para a ligação do ácido cafeico, foram testadas várias condições de reacção do agente oxidante com os filmes, tais como a concentração de KPS (0,25, 0,5 e 2,5 mM), o tempo (10, 30 e 60 min) e a temperatura de reacção (25, 40 e 60 °C) (Tabela 1). Na Tabela 3 pode-se observar que, em todas as condições de reacção testadas, os filmes de Q e de Q+CPTMS com ácido cafeico produzidos demonstraram não possuir actividade antioxidante ou possuir actividade antioxidante muito baixa. Como exemplo, na Figura 17 estão representados os resultados obtidos para a determinação da actividade antioxidante dos filmes de quitosana (Q_{controlo}CPTMS), quitosana com CPTMS e quitosana com CPTMS depois do *grafting* com uso de KPS 0,25 e 0,5 mM (10 min a 40 °C). Após o *grafting* do ácido cafeico ao filme de Q+CPTMS utilizando KPS 0,25 e 0,5 mM, os filmes apresentaram actividade antioxidante muito inferior à do filme de Q_{controlo}CPTMS sem adição de ácido cafeico (23% de inibição do ABTS) e do filme de Q+CPTMS (20%). Esta perda

de actividade antioxidante após o *grafting* pode ocorrer devido ao facto do KPS, além de originar radicais no átomo de azoto do grupo amina da quitosana, através dos quais se pode ligar o ácido cafeico, poder causar também a quebra das ligações glicosídicas da quitosana e com isso o polímero perde a sua estrutura e consequentemente as suas propriedades, tal como foi descrito por Hsu *et al.* [42].

Tabela 3 – Actividade antioxidante dos filmes de quitosana com *grafting* de ácido cafeico com recurso a KPS ou CAN como agentes oxidantes.

Nome do filme	Suporte do <i>grafting</i>	[KPS] (mM)	[CAN] (mM)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	% inibição (ABTS)
KPS01	Q+CPTMS	2,5	-	30	40	3,01 ± 0,84
KPS02	Q+CPTMS	2,5	-	10	40	0,72 ± 0,22
KPS03	Q+CPTMS	0,50	-	10	40	1,91 ± 0,85
KPS04	Q+CPTMS	0,25	-	30	40	0,0 ± 0,0
KPS05	Q+CPTMS	0,25	-	60	40	0,0 ± 0,0
KPS06	Q+CPTMS	0,25	-	10	40	0,22 ± 0,08
KPS07	Q+CPTMS	0,25	-	10	25	0,0 ± 0,0
KPS08	Q+CPTMS	0,25	-	10	60	0,0 ± 0,0
KPS09	Q	0,25	-	10	40	0,0 ± 0,0
KPS10	Q	0,25	-	10	60	**
KPS11	Q _{controlo} CPTMS	0,25	-	10	60	0,0 ± 0,0
CAN01	Q+CPTMS	-	6	60	40	0,0 ± 0,0
CAN02	Q+CPTMS*	-	6	60	40	0,0 ± 0,0
CAN03	Q+CPTMS	-	6	0	40	0,0 ± 0,0

* filme lavado com água destilada depois de reagir com CAN 6 mM antes da adição do ácido cafeico. ** O filme dissolveu-se durante o tempo de reacção.

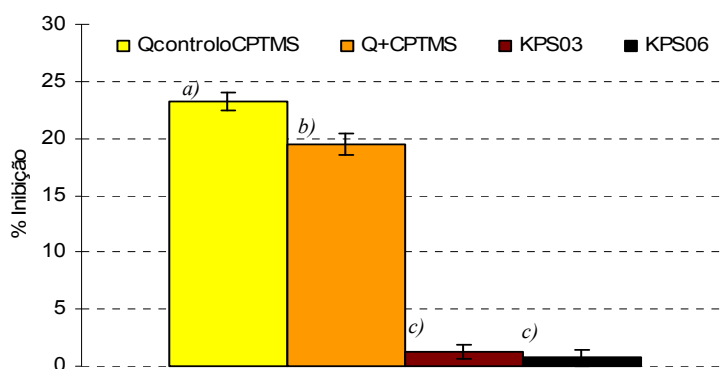


Figura 17 – Actividade antioxidante dos filmes de quitosana (Q_{controlo}CPTMS) e filmes híbridos de Q+CPTMS e Q+CPTMS+Caf com KPS 0,5 (KPS03) e 0,25 mM (KPS06). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$)

Na Figura 17 é visível que a actividade antioxidante do filme de quitosana (Q) é significativamente superior à do filme de Q+CPTMS. A actividade antioxidante da

quitosana está associada aos seus grupos amina [15]. Como o CPTMS se liga à quitosana por esses grupos [38], diminui o número de grupos amina livres e, conseqüentemente, é possível que origine a diminuição da capacidade antioxidante dos filmes híbridos de quitosana com CPTMS.

Devido a este insucesso com a utilização do KPS para a obtenção de filmes com actividade antioxidante superior, foi testado o uso de CAN como agente oxidante para o *grafting* dos filmes híbridos de quitosana (Q+CPTMS). O CAN já tinha sido descrito por vários autores, tais como Jung *et al.* [39] e Pourjavadi *et al.* [41], como sendo um agente oxidante eficiente para o *grafting* da quitosana. Diferentes condições de reacção foram testadas, tal como discriminado na Tabela 2. Foram ainda produzidos filmes em que estes foram lavados após a reacção com o CAN e antes da adição do ácido cafeico. No entanto, todos os filmes produzidos de Q+CPTMS utilizando CAN para o *grafting* de ácido cafeico não apresentaram capacidade antioxidante (Tabela 3).

Todas as condições de reacção testadas para o *grafting* do ácido cafeico aos filmes de Q e de Q+CPTMS, utilizando KPS ou CAN como agente oxidante, revelaram ser infrutíferas na produção de filmes com actividade antioxidante superior aos filmes de quitosana.

3.1.2. Solução de quitosana

Uma vez que não se obtiveram resultados positivos em termos de actividade antioxidante em todas as condições testadas anteriormente em filmes de quitosana, foi testado o *grafting* do ácido cafeico directamente à quitosana em solução aquosa de ácido acético, tal como descrito por Jung *et al.* [39]. Nestas condições, os resíduos de glucosamina da quitosana devem estar muito mais acessíveis ao CAN, do que quando a quitosana está em forma de filme, promovendo a ligação do ácido cafeico à quitosana.

Nos primeiros filmes produzidos foi utilizada uma solução de CAN 6 mM, que foi adicionada à quitosana em solução. Os filmes obtidos de quitosana com ácido cafeico não neutralizados apresentaram uma actividade antioxidante praticamente nula (Figura 18), muito inferior à actividade antioxidante do filme de quitosana não neutralizado (23%). Após a neutralização dos filmes com NaOH, há uma diminuição da capacidade antioxidante nos filmes de Q e um aumento nos de QCaf, apresentando ambos os filmes uma percentagem de inibição do ABTS de 5%.

Como o CAN é um agente oxidante, é possível que também possa oxidar o ácido cafeico a *orto*-quinona, visto que o potencial padrão de redução do par $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ é de 1,7 V [69] e o potencial padrão de redução do par *o*-quinona/ácido cafeico é de -30 mV [70]. Como a oxidação do ácido cafeico originaria a perda da sua actividade antioxidante, optou-se por testar a redução dos filmes com NaBH_4 em meio básico, depois da sua neutralização com NaOH. O potencial de oxidação em meio básico do boro-hidreto é de 1,24 V [71], sendo bastante superior ao da *o*-quinona (30 mV) [70]. Assim, o boro-hidreto tem maior capacidade para se oxidar, reduzindo a *o*-quinona a ácido cafeico, retomando a sua capacidade antioxidante. No entanto, os resultados da Figura 18 mostram que a actividade antioxidante dos filmes neutralizados e reduzidos não é significativamente diferente dos filmes de Q e QCaf com CAN 6 mM neutralizados.

Como o CAN complexa com as moléculas de glucosamina [43], o facto de não se terem obtido filmes com actividade antioxidante pode ser devido à quantidade de CAN ser muito inferior à quantidade de moléculas de glucosamina. Por esta razão foi testada a produção de filmes com ácido cafeico em que a concentração da solução de CAN foi aumentada 5 vezes (30 mM).

Na Figura 18, além da actividade antioxidante dos filmes de quitosana e de quitosana com ácido cafeico com CAN 6 mM, está também representada a actividade antioxidante dos filmes de quitosana com ácido cafeico com CAN 30 mM, ao fim de 24 horas. O aumento da concentração da solução de CAN para 30 mM permitiu produzir filmes com actividade antioxidante superior à dos filmes de Q e QCaf com CAN 6 mM, nomeadamente para os filmes neutralizados e filmes neutralizados e reduzidos.

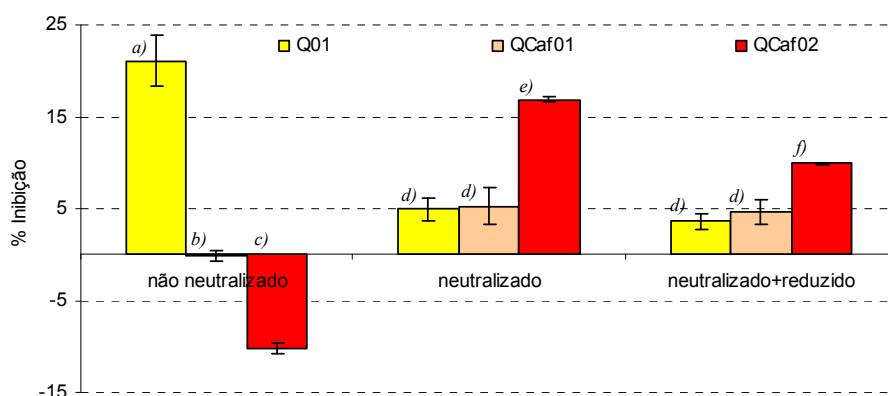


Figura 18 – Actividade Antioxidante de filmes de quitosana (Q01) e quitosana com ácido cafeico utilizando CAN 6 (QCaf01) e 30 (QCaf02) mM. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes $p < 0,05$ e $n=3$)

Uma vez que com a concentração de CAN 30 mM se conseguiu obter filmes com actividade antioxidante superior, efectuou-se o mesmo procedimento usando uma concentração de CAN superior (60 mM), na tentativa de aumentar o número de moléculas de ácido cafeico ligadas à quitosana e consequentemente incrementar a sua actividade antioxidante. Os resultados obtidos para a actividade antioxidante para cada um destes filmes são apresentados na Figura 19. Para aumentar a percentagem de inibição, esta passou a ser medida ao fim de 72 h e não de 24 h.

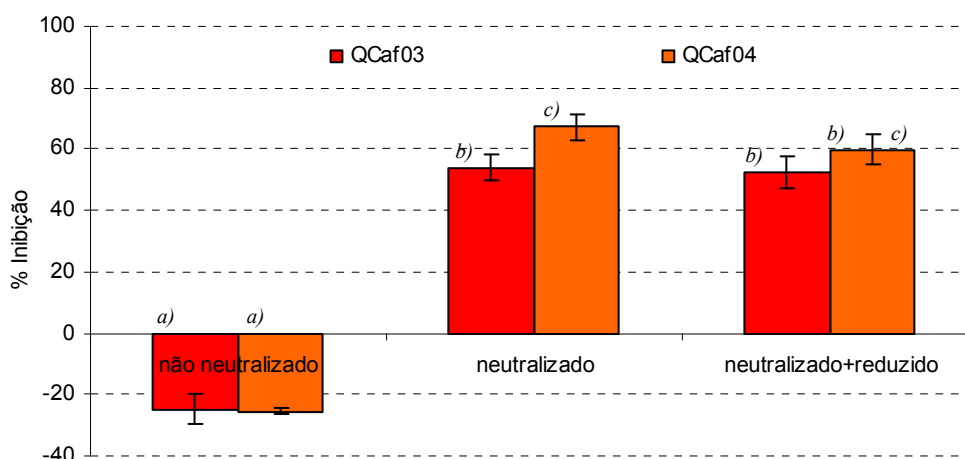


Figura 19 – Actividade antioxidante dos filmes de quitosana com ácido cafeico, usando CAN 30 (QCaf03) e 60 mM (QCaf04). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes $p < 0,05$ e $n=3$)

Pela análise da Figura 19 pode dizer-se que os filmes não neutralizados parecem apresentar uma capacidade pró-oxidante em vez de antioxidante, devido aos valores negativos obtidos. Isto indica que o ácido cafeico presente nestes filmes se poderá encontrar oxidado. A actividade antioxidante dos filmes neutralizados é semelhante à dos filmes neutralizados e reduzidos em ambas as condições, CAN 30 e 60 mM. Nestes filmes também se verifica que a neutralização com posterior redução dos filmes não aumenta a sua actividade antioxidante.

Os filmes neutralizados produzidos com CAN 60 mM têm uma actividade antioxidante significativamente superior à dos filmes obtidos com CAN 30 mM. Como o aumento da concentração de CAN de 30 mM para 60 mM não originou uma grande diferença na actividade antioxidante, não se justificou tentar uma concentração de CAN mais elevada. Assim, o uso da solução de CAN com concentração 60 mM foi a condição seleccionada para a produção de filmes de quitosana com *grafting* de ácido cafeico.

Após terem sido definidas as condições de produção dos filmes, com *grafting* de ácido cafeico, novos filmes foram produzidos com e sem adição de ácido cafeico. A Figura 20 compara a capacidade antioxidante de filmes de Q e filmes de QCaf obtidos com CAN 60 mM. Apenas para os filmes neutralizados, o filme de QCaf tem uma actividade antioxidante superior à do filme de Q. O filme de Q não neutralizado é o que possui maior capacidade antioxidante, não sendo significativamente diferente do filme de QCaf neutralizado.

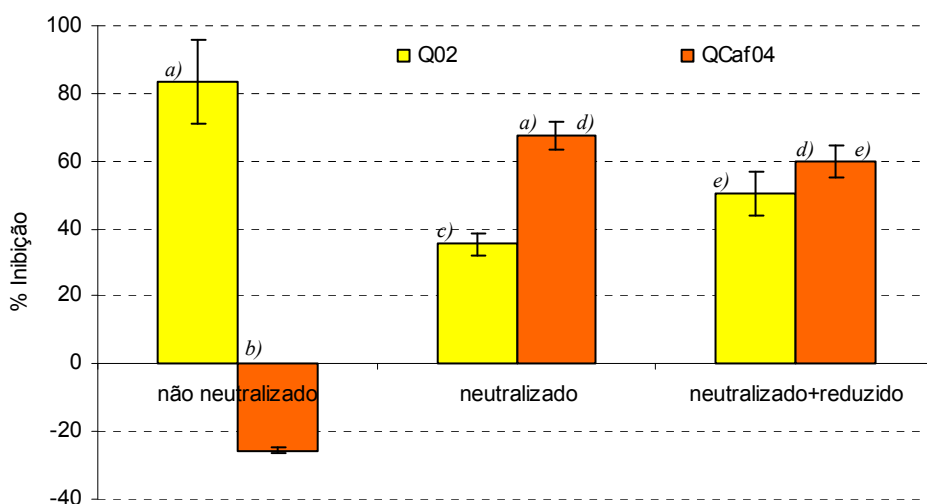


Figura 20 – Actividade antioxidante dos filmes de Q (Q02) e QCaf usando CAN 60 mM (QCaf04). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

O ácido cafeico é muito pouco solúvel em acetona. Como a quitosana depois do *grafting* do ácido cafeico se precipitou com acetona, parte do ácido cafeico não ligado à quitosana pode ter ficado misturada com o precipitado a partir do qual foram feitos os filmes de QCaf. A lavagem em Soxhlet com metanol serve então para retirar todo o ácido cafeico não ligado à quitosana, uma vez que este é muito solúvel em metanol.

Como o filme de quitosana não tinha sido lavado em Soxhlet, ao contrário dos filmes produzidos com ácido cafeico, para aferir se o *grafting* do ácido cafeico confere maior actividade antioxidante ao filme foi necessário lavar este filme em Soxhlet durante 2 h. Na Figura 21 está representada a actividade antioxidante dos filmes produzidos com e sem adição de ácido cafeico, mas em que todos os filmes foram lavados em Soxhlet. Pela análise deste gráfico verifica-se que o filme de quitosana não contendo ácido cafeico e não neutralizado apresenta uma actividade antioxidante inferior (40%) comparando com o

mesmo filme não lavado (Figura 20). Este resultado demonstra que com a lavagem existe um decréscimo de aproximadamente 50% na actividade antioxidante do filme apenas de quitosana. Isto pode ser devido ao facto da lavagem remover pequenas cadeias de oligoquitosana livres com capacidade antioxidante [7]. No entanto, verifica-se que os filmes com ácido cafeico produzidos posteriormente apresentam uma percentagem de inibição do ABTS ligeiramente superior, facto esse que se deve à variabilidade que se encontra quando se preparam novos filmes.

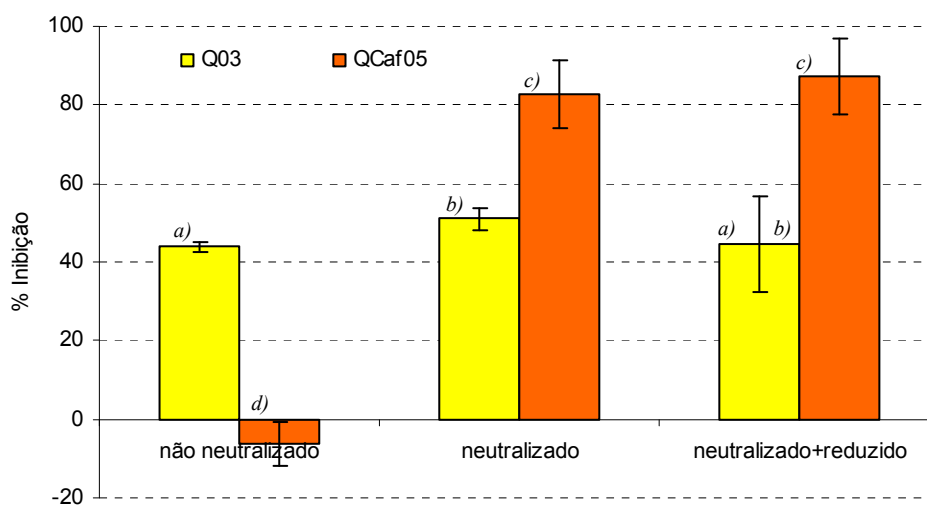


Figura 21 – Actividade antioxidante dos filmes de Q (Q03) e QCaf usando CAN 60 mM (QCaf05), lavados em Soxhlet. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

Na Figura 21, comparando os filmes de Q e QCaf, verifica-se que existem diferenças significativas entre eles, ou seja, o *grafting* do ácido cafeico incrementou a capacidade antioxidante em 62% nos filmes neutralizados e 96% nos filmes neutralizados e reduzidos. Estes resultados vão de encontro ao já descrito por vários autores [38, 39, 72], que efectuaram *grafting* de compostos fenólicos em quitosana e que obtiveram um aumento na sua capacidade antioxidante.

Os filmes de Q não neutralizados, neutralizados e neutralizados e reduzidos não apresentam diferenças significativas entre si, o que significa que os diferentes tratamentos não provocaram alterações na actividade antioxidante dos filmes apenas com quitosana. No entanto, nos filmes de QCaf a neutralização provocou um grande aumento na capacidade antioxidante do filme em relação ao filme não neutralizado. Os filmes de QCaf não neutralizados parecem ter uma actividade pró-oxidante e com a neutralização estes passam a possuir uma capacidade antioxidante superior a 80%. Entre os filmes de QCaf

neutralizados e QCaf neutralizados e reduzidos não há diferenças significativas. Estes resultados demonstram mais uma vez que a redução após a neutralização não traz vantagem em relação à neutralização dos filmes.

Para verificar se a actividade antioxidante dos filmes de QCaf com CAN 30 mM representada na Figura 18 era apenas devida ao ácido cafeico ligado à quitosana, estes filmes foram lavados no Soxhlet durante 2 e 4 h para verificar se todo o ácido cafeico livre era eliminado (Figura 22).

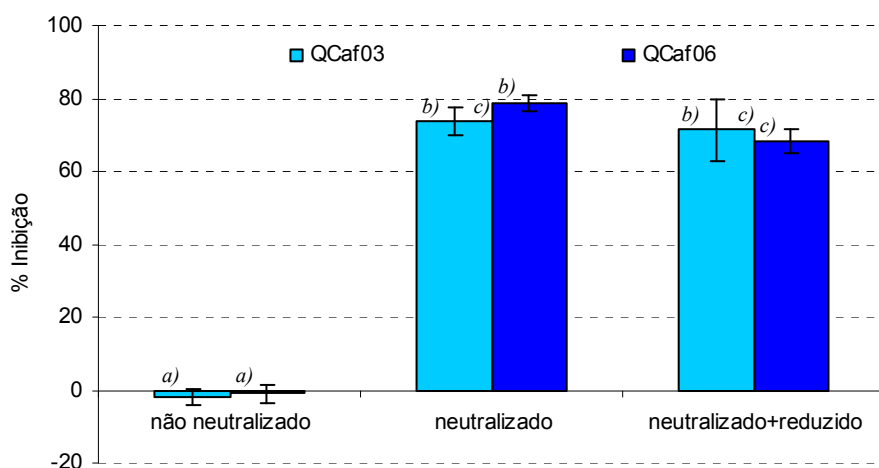


Figura 22 – Actividade antioxidante dos filmes quitosana com ácido cafeico lavados durante 2 (QCaf03) e 4 (QCaf06) horas. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

A actividade antioxidante dos filmes lavados 2 e 4 horas não apresenta diferenças significativas para o mesmo tratamento. Estes resultados demonstram que o tempo de lavagem de 2 h é suficiente para retirar todo o ácido cafeico não ligado à quitosana e que a actividade antioxidante dos filmes é apenas devida ao ácido cafeico ligado à molécula de quitosana. Para os filmes produzidos com CAN 60 mM não se efectuou o estudo representado na Figura 22 por se considerar que com uma concentração de CAN superior os resultados seriam semelhantes, visto que com uma concentração superior de CAN mais moléculas de ácido cafeico se ligarão à quitosana e por isso menos ácido cafeico estaria livre.

3.2. Crosslinking de genipin à quitosana com grafting de ácido cafeico em solução

O segundo objectivo deste trabalho era a produção de filmes resistentes a meio ácido. Assim, após otimizar a metodologia para a obtenção de filmes de quitosana com

actividade antioxidante superior, por *grafting* com ácido cafeico, procedeu-se à adição de *genipin* com a função de *crosslinker*.

3.2.1. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante dos filmes de quitosana, quitosana com *genipin*, quitosana com ácido cafeico e quitosana com ácido cafeico e *genipin* é apresentada na Figura 23. Para cada tipo de filme foram produzidos filmes não neutralizados, neutralizados e reduzidos.

Uma vez que, pelos resultados anteriores, para os filmes QCaf não havia vantagem na utilização da redução depois da neutralização, efectuou-se apenas a redução (segundo o mesmo procedimento) após a lavagem dos filmes em Soxhlet. A lavagem, neste caso, teve como objectivo a remoção de moléculas não ligadas, nomeadamente o *genipin* e o ácido cafeico.

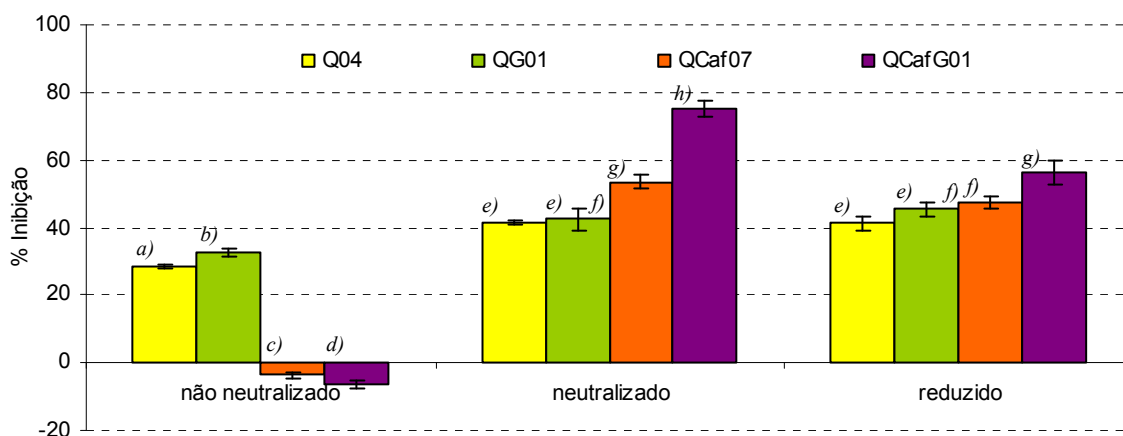


Figura 23 – Actividade antioxidante dos filmes de quitosana (Q04), quitosana com *genipin* (QG01), quitosana com ácido cafeico (QCaf07) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG01). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

Os resultados obtidos demonstram que os filmes com ácido cafeico (QCaf e QCafG) não neutralizados parecem ter capacidade pró-oxidante, tal como já tinha sido verificado anteriormente. Após a neutralização, o filme com ácido cafeico e *genipin* apresenta uma capacidade antioxidante 80% superior à do filme de Q neutralizado e 40% superior à do filme de QCaf neutralizado. A adição de *genipin* origina um aumento da capacidade antioxidante dos filmes, pois os filmes de QCafG têm uma actividade

antioxidante (75%) que é significativamente superior em relação aos de QCaf (54%). Este resultado está de acordo com o descrito por Lee *et al.* [73], isto é, que o *genipin* possui actividade antioxidante.

Uma vez que o ácido cafeico é adicionado à quitosana em meio ácido e com a presença de CAN, este, por ser um agente oxidante, pode provocar alterações na estrutura ou reacções de polimerização do ácido cafeico originando espécies que tenham actividade pró-oxidante. Segundo Andueza *et al.* [74], a decomposição térmica ou a decomposição do ácido cafeico em meio ácido pode originar produtos com capacidade pró-oxidante ou antioxidante. Em particular, o ácido cafeico tem tendência para descarboxilar formando o *p*-vinilcatecol que é nucleofílico e que facilmente pode gerar catiões com capacidade pró-oxidante [74]. Por outro lado, a polimerização do ácido cafeico pode ainda originar compostos do tipo fenilindanos com grande capacidade antioxidante [75].

A neutralização dos filmes contendo ácido cafeico origina filmes com elevada capacidade antioxidante, semelhante à dos filmes neutralizados e reduzidos. Estes factos parecem sugerir que o meio básico (neutralização com NaOH e/ou redução com NaBH₄ em NH₃) promove reacções com o ácido cafeico em que os produtos de reacção podem possuir maior capacidade antioxidante.

A actividade antioxidante dos filmes com ácido cafeico (QCaf e QCafG) que foram reduzidos é inferior à dos filmes neutralizados. Estes resultados mostram que a redução dos filmes não melhora a sua capacidade antioxidante, comprovando que não é devido à simples oxidação do ácido cafeico que os filmes não neutralizados não têm actividade antioxidante.

Os resultados apresentados para a actividade antioxidante dizem respeito à percentagem de inibição que cada cm² de filme possui, ou seja, tem em conta apenas a área de filme. Considerando que apenas a superfície do filme é importante para a sua actividade antioxidante, esta é a aproximação mais correcta para comparar a actividade antioxidante dos diferentes filmes produzidos. No entanto, não só a superfície do filme pode ser responsável pela sua actividade antioxidante, pois a solução pode penetrar no seu interior. Na figura 23 está representada a capacidade antioxidante para cada tipo de filme produzido tendo em conta a massa de filme presente em cada cm², uma vez que cada cm² de filme tem massa diferente consoante o tipo de filme.

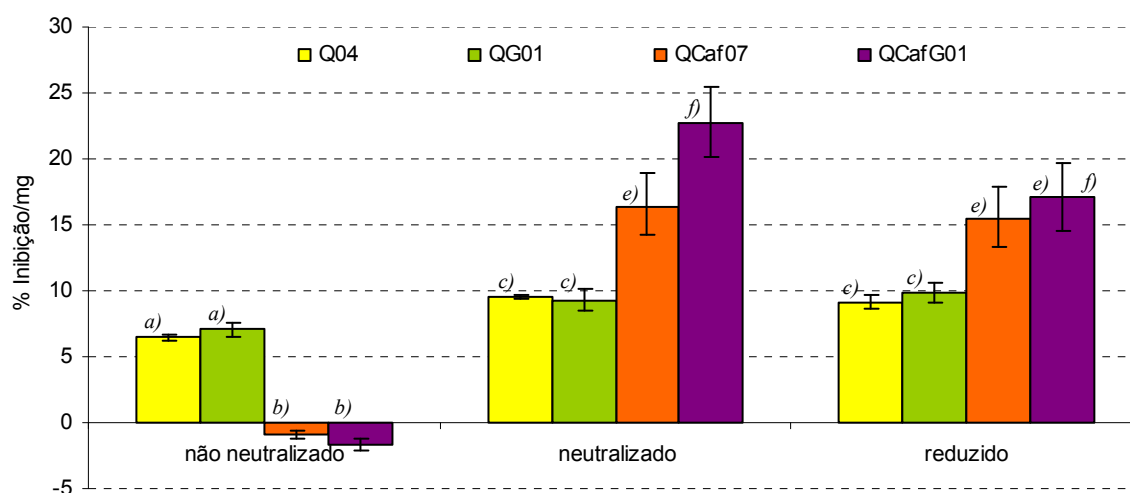


Figura 24 – Actividade antioxidante dos filmes de quitosana (Q04), quitosana com *genipin* (QG01), quitosana com ácido cafeico (QCaf07) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG01), por massa (mg) de filme. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

A tendência dos resultados apresentados na Figura 24 é semelhante à que tinha sido apresentada na Figura 23, isto é, o filme QCafG neutralizado é o que apresenta maior actividade antioxidante (23%). No entanto, a diferença entre a actividade antioxidante dos filmes com ácido cafeico (QCaf e QCafG) neutralizados e reduzidos em relação aos filmes de quitosana e quitosana com *genipin* são ainda mais significativas, pois estes filmes têm massas superiores por cm^2 em relação aos filmes de Q e QG. Estes resultados demonstram que, independentemente da forma como os filmes actuam em solução, considerando apenas a superfície do filme ou toda a sua massa, os filmes com ácido cafeico têm uma capacidade antioxidante superior.

3.2.2. Solubilidade

A solubilidade de todos os filmes (Q, QG, QCaf, QCafG) foi avaliada em soluções-matriz de vinho (10% de etanol e pH 3,5) durante 7 dias. Os resultados obtidos nos ensaios de solubilidade estão representados na Figura 25. Os filmes não neutralizados apresentam maior perda de massa do que os filmes neutralizados e reduzidos. Comparando os filmes neutralizados com os filmes reduzidos, verifica-se que a solubilidade é semelhante, excepto para o filme de QG que apresenta menor perda de massa do que o filme neutralizado (14%).

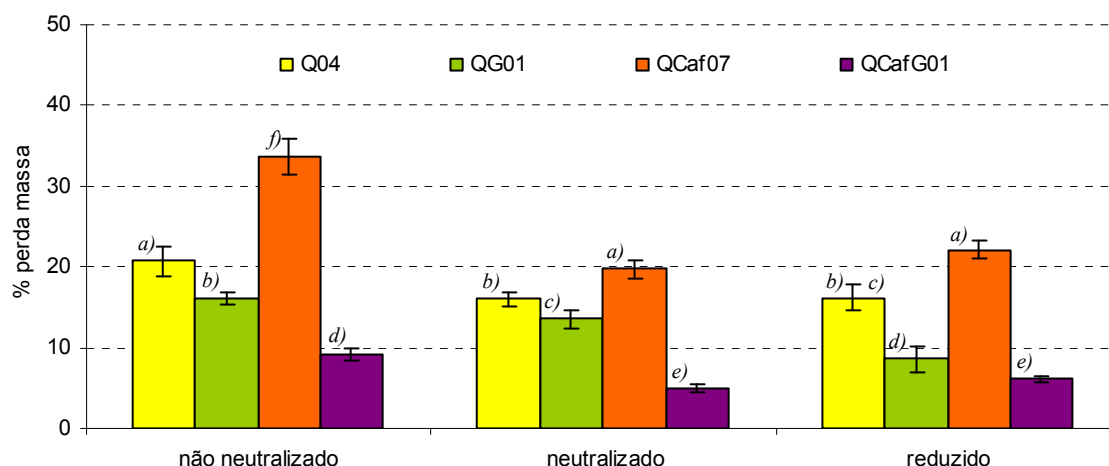


Figura 25 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q04), quitosana com *genipin* (QG01), quitosana com ácido cafeico (QCaf07) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG01) em solução modelo de vinho durante 7 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

Os filmes de QCaf são os que têm perdas de massa superiores em todos os tratamentos. A quitosana tem capacidade de formar filmes devido a interações electrostáticas entre os grupos hidroxilo e os grupos amina dos resíduos de glucosamina e o facto das cadeias de quitosana terem ligadas moléculas de ácido cafeico poderá provocar um impedimento no estabelecimento das referidas interações e por isso estes filmes se solubilizarem mais facilmente do que os filmes apenas de quitosana.

Os filmes com *genipin* (QG e QCafG) são os que apresentam menores solubilidades. Nos filmes de QG nota-se o efeito de *crosslinking* do *genipin* à quitosana, pois a perda de massa destes filmes é 35-50% inferior em relação aos de quitosana. Os filmes de QCafG, para todos os tratamentos, são os que apresentam solubilidades inferiores, sendo o neutralizado o que apresentou o valor menor (5%). O facto do ácido cafeico poder estar a afastar as cadeias de quitosana poderá promover uma maior acção do *genipin* na promoção do *crosslinking* das cadeias de quitosana, diminuindo assim ainda mais a solubilidade dos filmes QCafG em relação aos Q, QCaf e QG.

3.2.3. Validação da proposta de filme de quitosana insolúvel em meio ácido e com actividade antioxidante

Para comprovar os resultados obtidos para a actividade antioxidante, novos filmes de quitosana, quitosana com *genipin*, quitosana com ácido cafeico e quitosana com ácido cafeico e *genipin* foram produzidos usando a mesma metodologia. A capacidade antioxidante desses filmes é apresentada na Figura 26. A actividade antioxidante destes filmes tem algumas diferenças quando comparada com a dos filmes representados na Figura 23. Os filmes de QCaf e QCafG (neutralizados e reduzidos) têm capacidade antioxidante inferior (33 e 52%, respectivamente, quando neutralizados, e 32% para ambos quando reduzidos) à dos filmes de QCaf e QCafG anteriormente produzidos, tendo praticamente a mesma actividade que os filmes de Q também neutralizados e reduzidos (34%). No entanto, o filme de QCafG neutralizado é o que apresenta uma capacidade antioxidante significativamente superior em relação aos outros filmes. Mais uma vez se verificou que a redução não traz vantagem em relação à neutralização.

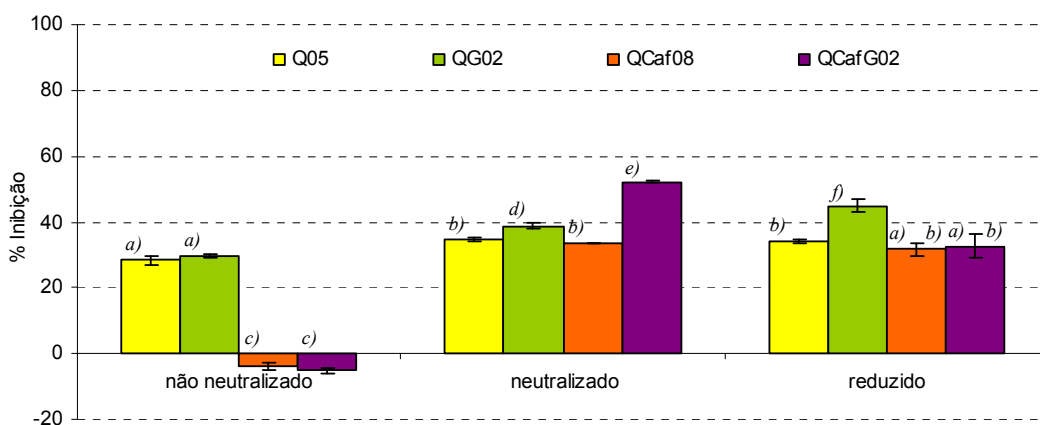


Figura 26 – Actividade antioxidante da repetição dos filmes de quitosana (Q05), quitosana com *genipin* (QG02), quitosana com ácido cafeico (QCaf08) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG02). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

Tal como na actividade antioxidante, também se repetiu a determinação da solubilidade em solução matriz de vinho durante 7 dias para novos filmes, como mostra a Figura 27. Comparando as perdas de massa entre estes filmes e os filmes preparados anteriormente, todos os filmes apresentaram os mesmos valores excepto o filme de QCaf neutralizado, que apresentou uma percentagem de perda de massa significativamente superior e o filme de QCaf neutralizado apresentou uma percentagem de perda de massa

significativamente inferior. A tendência do primeiro conjunto de filmes (Figura 25) mantém-se, isto é, o filme com menor solubilidade é o filme de QCafG neutralizado, não sendo no entanto significativamente diferente da solubilidade dos filmes de QG.

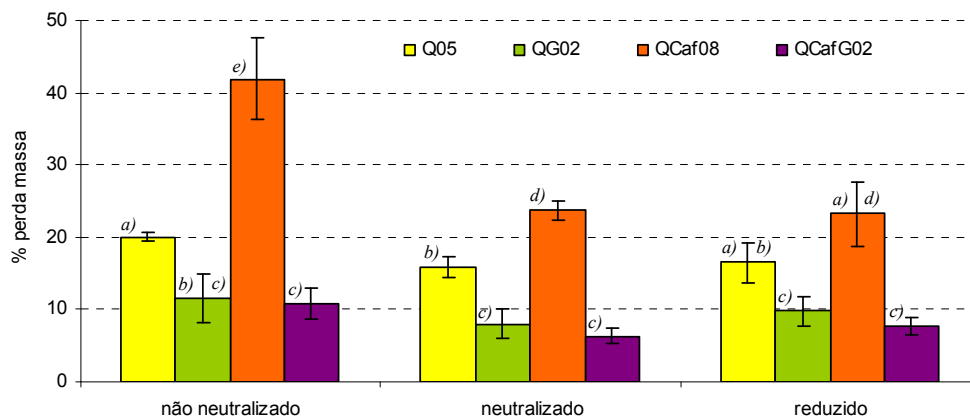


Figura 27 – Percentagem de perda de massa da repetição dos filmes de quitosana (Q05), quitosana com *genipin* (QG02), quitosana com ácido cafeico (QCaf08) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG02) em solução matriz durante 7 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

3.3. Caracterização dos filmes por FTIR

Os quatro tipos de filmes (Q, QG, QCaf e QCafG) não neutralizados foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) para verificar possíveis diferenças a nível estrutural. Na Figura 28 estão representados os espectros obtidos para os quatro tipos de filmes.

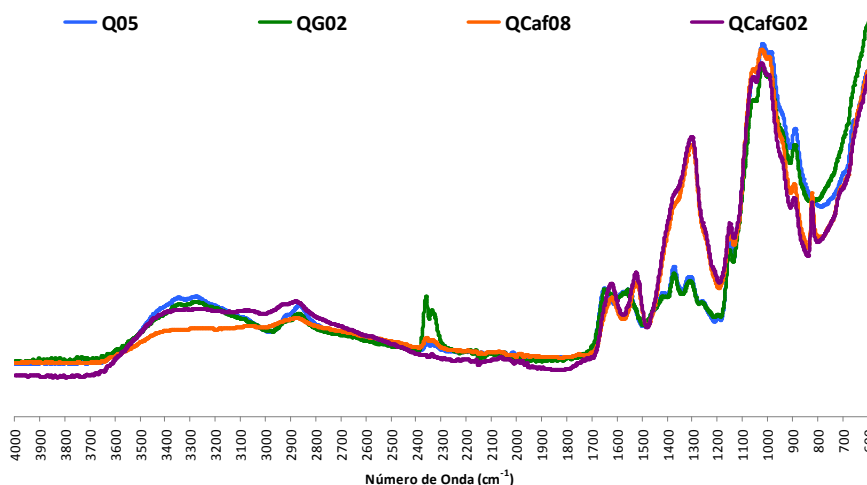


Figura 28 – Espectros de FTIR dos filmes de quitosana (Q05), quitosana com *genipin* (QG02), quitosana com ácido cafeico (QCaf08) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG02).

Existem diferenças entre os espectros dos filmes com ácido cafeico (QCaf e QCafG) e os que correspondem aos filmes sem ácido cafeico (Q e QG). As diferenças mais evidentes entre estes pares de filmes ocorrem a números de onda entre 1200-1500 cm^{-1} e 800-850 cm^{-1} . Esta diferença corresponderá provavelmente à presença do anel aromático originário do ácido cafeico [38, 76].

Para confirmar a distinção entre os filmes com ácido cafeico e com *genipin* procedeu-se à Análise por Componentes Principais (PCA) dos espectros de FTIR entre 1400 e 1800 cm^{-1} . Na Figura 29 está representada a PCA dos espectros de FTIR na zona entre 1400 e 1800 cm^{-1} dos filmes: o diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) (a) e o diagrama das contribuições factoriais (b).

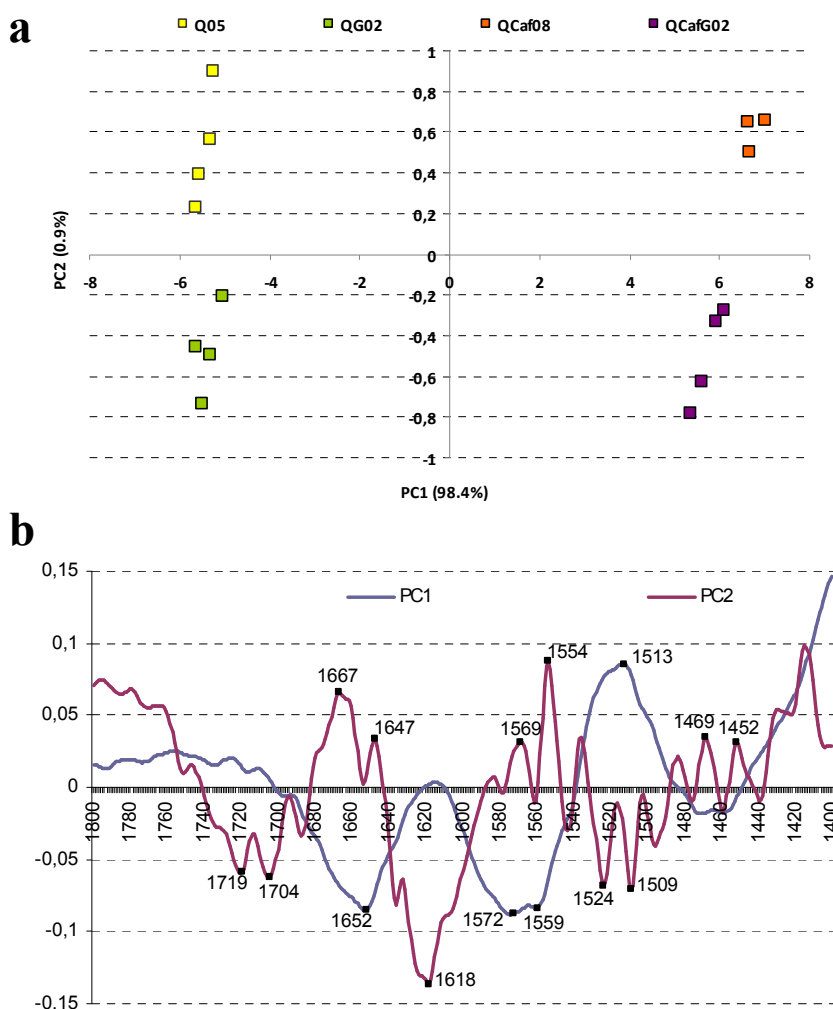


Figura 29 – Análise por componentes principais dos espectros de FTIR dos filmes de quitosana (Q05), quitosana com *genipin* (QG02), quitosana com ácido cafeico (QCaf08) e quitosana com ácido cafeico e *genipin* (QCafG02) não neutralizados: (a) diagrama das coordenadas factoriais; (b) diagrama das contribuições factoriais.

A análise por componentes principais mostra que os PC1 e PC2 representam 99,3% da variabilidade presente no espectro de infra-vermelho dos filmes, sendo o PC1 responsável por 98,4% e o PC2 por apenas 0,9%. Na Figura 29a observa-se que os filmes com ácido cafeico (QCaf e QCafG) estão localizados no PC1 positivo e no PC1 negativo estão os filmes sem ácido cafeico (Q e QG). Ao longo do PC2 verifica-se que a dispersão está relacionada com a presença de *genipin*, no PC2 positivo estão os filmes sem *genipin* (Q e QCaf) e no PC2 negativo os filmes com *genipin* (QG e QCafG).

Pela análise das contribuições factoriais (Figura 29b) verifica-se que para o PC1 negativo contribuem os picos a $1572\text{-}1559\text{ cm}^{-1}$ e a 1652 cm^{-1} . Os números de onda a ~ 1560 e $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao alongamento das ligações N-H e C=O, respectivamente [77], dos grupos amida da glucosamina, isto é quando os grupos amina do carbono 2 estão acetilados. O pico a $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao alongamento da ligação N-H dos grupos amina primários [77], estando estes grupos presentes em grande número na quitosana. No caso dos filmes com ácido cafeico, em que existe uma contribuição do PC1 positivo, estes estão relacionados com o pico a $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$. Este pico corresponde à vibração da ligação C=C do anel aromático originário do ácido cafeico [38]. A presença destes valores de número de onda confirma que o ácido cafeico está presente nestes filmes de quitosana.

A PC2 positiva está também relacionada com os picos característicos da quitosana (~ 1560 e $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$). No entanto, para a PC2 negativa contribuem os picos a $1509\text{-}1524\text{ cm}^{-1}$, 1618 cm^{-1} e $1704\text{-}1719\text{ cm}^{-1}$ e, segundo a bibliografia, os picos a ~ 1710 e $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao alongamento da ligação C=O do anel de *genipin* quando este abre para se ligar à quitosana e C=C do ciclo-alceno do anel de *genipin* [36]. Números de onda a $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$ corresponderão ao alongamento da ligação do anel de aminas heterocíclicas, comprovando que o *genipin* está ligado à quitosana [28]. A presença destes valores de números de onda parece demonstrar que o *genipin* está ligado aos grupos amina das moléculas de quitosana, segundo o mecanismo 1 (Figura 8, Reacção 2) descrito no ponto 1.1.3 do capítulo 1. Estes resultados parecem indicar que o *crosslinking* do *genipin* com as cadeias de quitosana ocorre apenas utilizando o mecanismo 2 (Figura 10), uma vez que não se verifica a presença de picos relativos ao alongamento das ligações N-H e C=O (~ 1560 e $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) de grupos amida resultantes da ligação do *genipin* à quitosana segundo a Reacção 1 do Mecanismo 1 (Figura 9), descrita no capítulo 1.

Capítulo 4 – Conclusão

Capítulo 4 – Conclusão

Na primeira parte do trabalho desenvolvido nesta dissertação foi possível estabelecer uma metodologia para a produção de filmes com base em quitosana com actividade antioxidante superior à da própria quitosana. A metodologia desenvolvida baseia-se na ligação do ácido cafeico, um composto fenólico com elevada actividade antioxidante, à estrutura da quitosana. As condições que revelaram ser as melhores para a produção destes filmes foram a utilização de hexanitrocerato (IV) de amónio (CAN) como agente oxidante numa concentração 60 mM, para ligação do ácido cafeico por mecanismo radicalar, em que a reacção tem de ocorrer na quitosana em solução aquosa de ácido acético a 5%. Este trabalho também demonstrou que a neutralização dos filmes origina um aumento da sua capacidade antioxidante. Assim, esta metodologia permite obter filmes com uma actividade antioxidante 50% superior aos filmes apenas com quitosana.

Os filmes de quitosana e os filmes desenvolvidos de quitosana com ácido cafeico eram solúveis em meio ácido. Com o objectivo de diminuir a sua solubilidade, foram produzidos filmes com ácido cafeico em que também foi adicionado *genipin*. Este composto tem a função de *crosslinker* pois consegue ligar duas cadeias de quitosana em simultâneo. Estes filmes apresentaram uma solubilidade muito baixa (5%), reduzindo a perda de massa numa solução hidroalcoólica em cerca de 50% em relação aos filmes de quitosana e de 75% em relação aos de quitosana com ácido cafeico. Estes filmes também revelaram ter uma capacidade antioxidante 40% superior aos filmes de quitosana com ácido cafeico.

As características dos filmes de quitosana com ácido cafeico e *genipin* produzidos segundo a metodologia desenvolvida neste trabalho têm elevada actividade antioxidante e baixa solubilidade, pelo que podem ser ensaiados em vinho como possíveis substitutos da adição de SO₂.

Capítulo 5 – Trabalho Futuro

Capítulo 5 – Trabalho Futuro

Tendo em conta os resultados obtidos e a aplicação prevista para os filmes desenvolvidos, torna-se agora necessário testar o uso do filme de quitosana com ácido cafeico e *genipin* no vinho, estudando a influência deste filme nas propriedades de vinho ao longo do tempo de armazenamento.

A metodologia desenvolvida para a produção de filmes pode ser testada com outros compostos com actividade antioxidante, mas que possuam uma ligação vinílica, com o intuito de melhorar as propriedades dos filmes.

Os filmes com ácido cafeico (quitosana com ácido cafeico e de quitosana com ácido cafeico e *genipin*) não neutralizados têm capacidade pró-oxidante. Será interessante o estudo dessa propriedade para outras possíveis aplicações.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

1. Kurita, K., *Controlled functionalization of the polysaccharide chitin*. Progress in Polymer Science, 2001. **26**(9): 1921-1971.
2. Prashanth, K. V. H. and Tharanathan, R. N., *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(3): 117-131.
3. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): 603-632.
4. Santhosh, S. and Mathew, P. T., *Preparation and properties of glucosamine and carboxymethylchitin from shrimp shell*. Journal of Applied Polymer Science, 2008. **107**(1): 280-285.
5. Raabe, D., Sachs, C., and Romano, P., *The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material*. Acta Materialia, 2005. **53**(15): 4281-4292.
6. Pillai, C. K. S., Paul, W., and Sharma, C. P., *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. Progress in Polymer Science, 2009. **34**(7): 641-678.
7. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., and Heras, Á., *Functional characterization of chitin and chitosan*. Current Chemical Biology, 2009. **3**: 203-230.
8. Krajewska, B., *Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials*. Separation and Purification Technology, 2005. **41**(3): 305-312.
9. Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., and Minami, S., *Analgesic effects of chitin and chitosan*. Carbohydrate Polymers, 2002. **49**(3): 249-252.
10. Muzzarelli, R. A. A., Orlandini, F., Pacetti, D., Boselli, E., Frega, N. G., Tosi, G., and Muzzarelli, C., *Chitosan taurocholate capacity to bind lipids and to undergo enzymatic hydrolysis: An in vitro model*. Carbohydrate Polymers, 2006. **66**(3): 363-371.
11. Ogawa, S., Decker, E. A., and McClements, D. J., *Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(18): 5522-5527.
12. Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S., *Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **71**(2-3): 235-244.
13. Roller, S. and Covill, N., *The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **47**(1-2): 67-77.
14. Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., and Yao, K. D., *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan*. Journal of Applied Polymer Science, 2001. **79**(7): 1324-1335.
15. Park, P.-J., Je, J.-Y., and Kim, S.-K., *Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer*. Carbohydrate Polymers, 2004. **55**(1): 17-22.
16. Leopoldi, M., Marino, T., Russo, N., and Toscano, M., *Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism*. The Journal of Physical Chemistry A, 2004. **108**: 4916-4922.
17. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(9-10): 1231-1237.
18. Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., and Rice-Evans, C. A., *Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **282**(5): 1161-1168.
19. Mourya, V. K. and Inamdar, N. N., *Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore*. Reactive and Functional Polymers, 2008. **68**(6): 1013-1051.
20. Prashanth, K. V. H. and Tharanathan, R. N., *Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers*. Carbohydrate Polymers, 2003. **54**(3): 343-351.
21. Enescu, D., Hamciuc, V., Pricop, L., Hamaide, T., Harabagiu, V., and Simionescu, B., *Polydimethylsiloxane-modified chitosan I. Synthesis and structural characterisation of graft and crosslinked copolymers*. Journal of Polymer Research, 2009. **16**(1): 73-80.
22. Prashanth, K. V. H. and Tharanathan, R. N., *Crosslinked chitosan - preparation and characterization*. Carbohydrate Research, 2006. **341**(1): 169-173.

23. Chao, A.-C., *Preparation of porous chitosan/GPTMS hybrid membrane and its application in affinity sorption for tyrosinase purification with Agaricus bisporus*. Journal of Membrane Science, 2008. **311**(1-2): 306-318.
24. Chen, J. H., Liu, Q. L., Zhang, X. H., and Zhang, Q. G., *Pervaporation and characterization of chitosan membranes cross-linked by 3-aminopropyltriethoxysilane*. Journal of Membrane Science, 2007. **292**(1-2): 125-132.
25. Airoldi, C. and Monteiro, O. A. C., *Chitosan-organosilane hybrids - syntheses, characterization, copper adsorption, and enzyme immobilization*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **77**(4): 797-804.
26. Uragami, T., Katayama, T., Miyata, T., Tamura, H., Shiraiwa, T., and Higuchi, A., *Dehydration of an ethanol/water azeotrope by novel organic-inorganic hybrid membranes based on quaternized chitosan and tetraethoxysilane*. Biomacromolecules, 2004. **5**(4): 1567-1574.
27. Chen, H., Ouyang, W., Lawuyi, B., Martoni, C., and Prakash, S., *Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. **75A**(4): 917-927.
28. Mi, F.-L., Sung, H.-W., and Shyu, S.-S., *Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2000. **38**(15): 2804-2814.
29. Jin, J., Song, M., and Hourston, D. J., *Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties*. Biomacromolecules, 2004. **5**(1): 162-168.
30. Beari, F., Brand, M., Jenkner, P., Lehnert, R., Metternich, H. J., Monkiewicz, J., and Siesler, H. W., *Organofunctional alkoxysilanes in dilute aqueous solution: new accounts on the dynamic structural mutability*. Journal of Organometallic Chemistry, 2001. **625**(2): 208-216.
31. Bartkowiak, M., Pelech, R., and Milchert, E., *Ammonolysis of (3-chloropropyl)trimethoxysilane*. Journal of Hazardous Materials, 2006. **136**(3): 854-858.
32. Ono, M., Ueno, M., Masuoka, C., Ikeda, T., and Nohara, T., *Iridoid glucosides from the fruit of Genipa americana*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005. **53**(10): 1342-1344.
33. Muzzarelli, R. A. A., *Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids*. Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(1): 1-9.
34. Park, J.-E., Lee, J.-Y., Kim, H.-G., Hahn, T.-R., and Paik, Y.-S., *Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of Gardenia jasminoides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(22): 6511-6514.
35. Butler, M. F., Ng, Y.-F., and Pudney, P. D. A., *Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2003. **41**(24): 3941-3953.
36. Mi, F.-L., Shyu, S.-S., and Peng, C.-K., *Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2005. **43**(10): 1985-2000.
37. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R. L., and Mano, J. F., *Graft copolymerized chitosan - present status and applications*. Carbohydrate Polymers, 2005. **62**(2): 142-158.
38. Shiu, J. C., Ho, M.-H., Yu, S.-H., Chao, A.-C., Su, Y.-R., Chen, W.-J., Chiang, Z.-C., and Yang, W. P., *Preparation and characterization of caffeic acid grafted chitosan/CPTMS hybrid scaffolds*. Carbohydrate Polymers, 2010. **79**: 724-730.
39. Jung, B.-O., Chung, S.-J., and Lee, S. B., *Preparation and characterization of eugenol-grafted chitosan hydrogels and their antioxidant activities*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **99**: 3500-3506.
40. Sousa, F., Guebitz, G. M., and Kokol, V., *Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids*. Process Biochemistry, 2009. **44**: 749-756.
41. Pourjavadi, A., Mahdavinia, G. R., Zohuriaan-Mehr, M. J., and Omidian, H., *Modified chitosan. I. Optimized cerium ammonium nitrate-induced synthesis of chitosan-graft-polyacrylonitrile*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **88**(8): 2048-2054.
42. Hsu, S.-C., Don, T.-M., and Chiu, W.-Y., *Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate*. Polymer Degradation and Stability, 2002. **75**(1): 73-83.
43. Zohuriaan-Mehr, M. J., *Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: A comprehensive review*. Iranian Polymer Journal, 2005. **14**(3): 235-265.
44. Dutta, P. K., Dutta, J., and Tripathi, V., *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. Journal of scientific & industrial research, 2004. **63**(1): 20-31.

45. Crini, G., *Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment*. Progress in Polymer Science, 2005. **30**(1): 38-70.
46. Guibal, E., *Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review*. Separation and Purification Technology, 2004. **38**(1): 43-74.
47. Chung, Y.-C., Li, Y.-H., and Chen, C.-C., *Pollutant removal from aquaculture wastewater using the biopolymer chitosan at different molecular weights*. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2005. **40**(9): 1775 - 1790.
48. Aberg, C. M., Chen, T., Olumide, A., Raghavan, S. R., and Payne, G. F., *Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysate to chitosan. Potential for value-added byproducts from food-processing wastes*, in *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, American Chemical Society. 788-793.
49. Martín-Diana, A. B., Rico, D., Barat, J. M., and Barry-Ryan, C., *Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009. **10**(4): 590-600.
50. Spagna, G., Barbagallo, R. N., and Pifferi, P. G., *Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(10): 4619-4627.
51. Yingyuad, S., Ruamsin, S., Reekprakhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S., and Siripatrawan, U., *Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork*. Packaging Technology and Science, 2006. **19**(3): 149-157.
52. Soutos, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D., and Ambrosiadis, I., *Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages*. Meat Science, 2008. **80**(4): 1150-1156.
53. Cerqueira, M. A., Sousa-Gallagher, M. J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., and Vicente, A. A., *Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of "Regional" cheese*. Journal of Food Engineering, 2010. **97**(1): 87-94.
54. Galed, G., Fernández-Valle, M. E., Martínez, A., and Heras, A., *Application of MRI to monitor the process of ripening and decay in citrus treated with chitosan solutions*. Magnetic Resonance Imaging, 2004. **22**(1): 127-137.
55. No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., and Xu, Z., *Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review*. Journal of Food Science, 2007. **72**(5): R87-R100.
56. Ribeiro, C., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., and Miranda, C., *Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence*. Postharvest Biology and Technology, 2007. **44**(1): 63-70.
57. Devlieghere, F., Vermeulen, A., and Debevere, J., *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables*. Food Microbiology, 2004. **21**(6): 703-714.
58. Caner, C. and Cansiz, O., *Effectiveness of chitosan-based coating in improving shelf-life of eggs*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007. **87**(2): 227-232.
59. Reg. (CE) n° 606/2009, Anexo I B – A;
60. Belitz, H.-D. and Grosch, W., *Food Chemistry*. 1999: Springer.
61. Barbe, J.-C., Revel, G. d., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A., *Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(8): 3413-3419.
62. Machado, R. M. D., Toledo, M. C. F., and Vicente, E., *Sulfite content in some Brazilian wines: analytical determination and estimate of dietary exposure*. European Food Research and Technology, 2009. **229**(3): 383-389.
63. Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V., *Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms*. Food Microbiology, 2008. **25**(2): 422-427.
64. Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., and Riponi, C., *Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(10): 1501-1507.
65. Abee, T., Krockel, L., and Hill, C., *Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning*. International Journal of Food Microbiology, 1995. **28**(2): 169-185.

66. Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., and Martín-Belloso, O., *Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields*. European Food Research and Technology, 2008. **227**(2): 401-408.
67. Mok, C., Song, K.-T., Park, Y.-S., Lim, S., Ruan, R., and Chen, P., *High hydrostatic pressure pasteurization of red wine*. Journal of Food Science, 2006. **71**(8): M265-M269.
68. Barros, A. S., *Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques*, Ph.D. Thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, France, 1999
69. Skoog, D. A., West, D. M., and Holler, F. J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7th ed. 1996: Saunders College Publishing.
70. Giacomelli, C., Ckless, K., Galato, D., Miranda, F. S., and Spinelli, A., *Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2002. **13**: 332-338.
71. Gaylord, N. G., *Reduction with complex metal hydrides*. Journal of Chemical Education, 1957. **34**(8): 367-374.
72. Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., and Orlandi, M., *Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds*. Enzyme and Microbial Technology, 2008. **43**(2): 84-92.
73. Lee, J.-H., Lee, D.-U., and Jeong, C.-S., *Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats*. Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(6): 1127-1131.
74. Andueza, S., Manzocco, L., Paz de Peña, M., Cid, C., and Nicoli, C., *Caffeic acid decomposition products: Antioxidants or pro-oxidants?* Food Research International, 2009. **42**(1): 51-55.
75. Guillot, F. L., Malnoë, A., and Stadler, R. H., *Antioxidant properties of novel tetraoxygenated phenylindan isomers formed during thermal decomposition of caffeic acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(9): 2503-2510.
76. Xu, P., Uyama, H., Whitten, J. E., Kobayashi, S., and Kaplan, D. L., *Peroxidase-catalyzed in situ polymerization of surface orientated caffeic acid*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(33): 11745-11753.
77. Pawlak, A. and Mucha, M., *Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends*. Thermochimica Acta, 2003. **396**(1-2): 153-166.